

**CONTEO AUTOMÁTICO DE DIVISIONES CELULARES EN PLACAS
HISTOLÓGICAS CON LEIOMIOSARCOMA, TUMOR ESTROMAL
GASTROINTESTINAL Y CÁNCER DE MAMA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
DEL VALLE EVARISTO GARCÍA (H.U.V)**

**CINDY JOHANA FONSECA OSPINA
VALERIA MARIN MONTEALEGRE**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**CONTEO AUTOMÁTICO E DIVISIONES CELULARES EN PLACAS
HISTOLÓGICAS CON LEIOMIOSARCOMA, TUMOR ESTROMAL
GASTROINTESTINAL Y CÁNCER DE MAMA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
DEL VALLE EVARISTO GARCÍA (HUV)**

**CINDY JOHANA FONSECA OSPINA
VALERIA MARIN MONTEALEGRE**

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero Biomédico**

**Director
JUAN DIEGO PULGARÍN GIRALDO.
Ingeniero Electrónico
Magister en ingeniería - Automatización industrial**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

Nota de aceptación

Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de Ingenieras Biomédicas.

PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS

Jurado

PAULO CESAR CALVO ECHEVERRY

Jurado

Santiago de Cali, Agosto 11 de 2014

CONTENIDO

	pág.
GLOSARIO	13
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	16
1. ANTECEDENTES	17
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	20
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS	24
5. MARCO REFERENCIAL	25
5.1 ALCANCES	25
5.2 LIMITACIONES	25
5.3 METODOLOGÍA	26
5.3.1 Requisitos	26
5.3.2 Análisis	27
5.3.3 Diseño	27

5.3.4 Implementación	27
5.3.5 Pruebas	28
5.4 MARCO TEÓRICO	28
5.4.1 Grado de diferenciación tumoral	29
5.4.1.1 Diferenciación histológica	29
5.4.1.2 Pleomorfismo nuclear	29
5.4.1.3 Índice mitótico	30
5.4.2 Procesamiento digital de imágenes (PDI)	31
5.4.2.1 Adquisición	31
5.4.2.2 Pre-procesamiento	31
5.4.2.3 Segmentación	32
6. DESARROLLO DEL SISTEMA	34
6.1 DETERMINACIÓN DE LAS NECESIDADES DE LOS MÉDICOS PATÓLOGOS	34
6.1.1 Elección de la técnica de procesamiento para la elaboración de la herramienta	40
6.1.2 Caso de uso y diagrama UML	43
6.2 DIGITALIZACIÓN DE LAS PLACAS HISTOLÓGICAS	44
6.2.1 Adquisición de videos	44
6.2.2 Adquisición de Imágenes a través de fotogramas	49
6.3 DISEÑO DE LA HERRAMIENTA SISTEMÁTICA	56
6.3.1 Obtención de patrones morfológicos para selección de mitosis en placa histológica	56
6.3.2 Selección del canal de color	58

6.3.2.1 Planos RGB	58
6.3.2.2 Formación en Blue Ratio	58
6.3.3 Pre procesamiento	60
6.3.3.1 Selección del campo a analizar	60
6.3.3.2 Filtro High Boost en Fourier	61
6.3.3.3 Umbralización	61
6.3.4 Segmentación	62
6.3.4.1 Eliminación de las regiones grandes	62
6.3.4.2 Eliminación de regiones muy pequeñas	63
6.3.4.3 Eliminación de objetos presentes en área de baja densidad de píxeles	64
6.3.5 Algoritmo detector de posibles mitosis	64
6.3.5.1 Detección de centroides de las células	64
6.3.5.2 Extracción de las características fenotípicas de las candidatas	65
6.3.5.3 Medir distancia entre los centroides	67
6.3.5.4 Marcar objetos que cumplen con el criterio de mitosis y contar	68
7. RESULTADOS OBTENIDOS	72
8. CONCLUSIONES	74
9. RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	80

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Requerimientos y objetivos de la herramienta computacional	35
---	----

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Requisitos y artefactos	26
Cuadro 2. Tabla de determinación de las necesidades del médico patólogo	34
Cuadro 3. Matriz QFD de evaluación de restricciones técnicas y requerimientos	36
Cuadro 4. Lenguajes de programación y especificaciones técnicas	37
Cuadro 5. Matriz de comparación por pares ponderada	38
Cuadro 6. Matriz de evaluación por pares ponderada de las alternativas para desarrollar la herramienta	39
Cuadro 7. Resultados del AHP, para elección de herramienta computacional	40
Cuadro 8. Matriz de comparación por pares ponderada de la técnica de procesamiento.	41
Cuadro 9. Matriz de evaluación por pares ponderada de las alternativas para implementar una técnica de procesamiento digital.	42
Cuadro 10. Resultado de la elección de la técnica a implementar con AHP	42
Cuadro 11. Especificaciones de la captura de los videos de análisis histológico de gis, cáncer de mama y leiomiomasarcoma.	46
Cuadro 12. Factores controlados y no controlados del protocolo de adquisición de videos	47
Cuadro 13. Decisiones tomadas sobre los factores no controlados	48
Cuadro 14. Factores incluyentes y excluyentes para el fotograma a generar a partir del video, para la selección de la muestra de imágenes a realizar procesamiento	49
Cuadro 15. Ajustes de exportación de fotograma en adobe pro premiere CS6 para MAC	50

Cuadro 16. Especificaciones del fotograma para análisis histológico de GIS, cáncer de mama y leiomiosarcoma. procesados con el adobe premiere pro CS6	52
Cuadro 17. Características de las imágenes.	55
Cuadro 18. Patrones de determinación de verdaderas y falsas mitosis al microscopio por tinción de H&E.	56
Cuadro 19. Características fenotípicas obtenidas de una muestra de 31 campos en los diferentes tipos de cáncer trabajados.	66
Cuadro 20. Establecimiento de máximos y mínimos para desarrollo del algoritmo que detecta mitosis bajo parámetro fenotípicos.	67
Cuadro 21. Caracterización de la distancia entre las células en proceso de mitosis.	68
Cuadro 22. Establecimiento de máximos y mínimos para desarrollo del algoritmo que detecta mitosis bajo parámetros fenotípicos en las etapas de anafase y telofase.	68
Cuadro 23. Desempeño de la herramienta computacional MARCADOR NO DEFINIDO.	¡ERROR!

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Metodología UML para desarrollo de software.	26
Figura 2. Placa histológica con pleomorfismo nuclear.	30
Figura 3. Placa histológica con mínima actividad mitótica.	30
Figura 4. Placa histológica con tumor estromal gastrointestinal (GIS).	31
Figura 5. Mejora de una imagen por sustracción.	32
Figura 6. Reducción el ruido De Una Imagen.	32
Figura 7. Proceso de análisis jerárquico (AHP).	39
Figura 8. Diagrama de casos de uso	43
Figura 9. Diagrama UML de la plataforma encargada de contar mitosis.	44
Figura 10. Montaje para la toma de muestras.	45
Figura 11. Importación del video de cáncer de mama con el Adobe Pro Premiere CS6 para MAC.	50
Figura 12. Selección de características, ajustes de exportación y procesamiento.	51
Figura 13. Placa histológica de cáncer de mama.	53
Figura 14. Placa histológica de cáncer por tumor estromal gastrointestinal (G.I.S).	54
Figura 15. Placa histológica de leiomiosarcoma.	55
Figura 16. Distancia mínima entre dos células.	57
Figura 17. Diagrama de flujo de la herramienta de procesamiento de imágenes histológicas.	58
Figura 18. Planos RGB de la imagen de entrada de cáncer de mama.	59

Figura 19. Imagen blue ratio.	60
Figura 20. Segmento de la imagen seleccionada en formato BR.	61
Figura 21. Segmento de la imagen umbralizada.	62
Figura 22. Resta de regiones grandes.	63
Figura 23. Imagen de segmentos sin las regiones pequeñas a 6 pixeles de radio.	63
Figura 24. Imagen con segmentos que son mayores a 200 pixeles.	64
Figura 25. Detección de centroides de las candidatas a mitosis.	65
Figura 26. Detección de radios de las candidatas a mitosis.	67
Figura 27. Detección de mitosis en caso de cáncer de mama.	69
Figura 28. Caso de mitosis en tejido con leomiosarcoma	69
Figura 29. Detección de mitosis en caso con leomiosarcoma.	70
Figura 30. Detección de mitosis en caso con tumor estromal gastrointestinal (GIS).	70
Figura 31. Interfaz de la herramienta computacional.	71

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Tabla de caracterización de distancia entre centroides, área, perímetro, redondez y radio de células en proceso mitótico.	80
Anexo B. Carta de verificación del especialista.	81

GLOSARIO

ANAFASE: tercera fase de la mitosis (división celular), en la cual los cromosomas se separan formando dos grupos o estrellas, uno en cada polo de la célula.

APOPTOSIS: es una destrucción o muerte celular programada provocada por ella misma, con el fin de auto controlar su desarrollo y crecimiento, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

CROMATINA: material cromosómico que contiene material genético y proteínas y que se encuentra en el núcleo de la célula.

DISTANCIA EUCLIDIANA: es la distancia ordinaria (que normalmente se mediría con una regla) entre dos puntos de un espacio euclídeo, la cual se deduce a partir del teorema de Pitágoras.

FALSOS POSITIVOS: es un error por el cual al realizar una prueba complementaria, su resultado indica una enfermedad, cuando en realidad no la hay.

FALSOS NEGATIVOS: es un error por el cual al realizar una exploración física o una prueba complementaria su resultado es normal o no detecta la alteración, cuando en realidad hay una enfermedad en el paciente.

HEMATOXILINA & EOSINA (H&E): tinción utilizada con frecuencia para tratar los cortes tisulares en los portaobjetos para el examen microscópico.

HERRAMIENTA COMPUTACIONAL: herramienta que se ajusta o sigue a un sistema o conjunto de elementos ordenados para la prevención, diagnóstico, tratamiento, rehabilitación, y mejoría de pacientes con problemas que afectan su salud.

METAFASE: segunda fase de la mitosis (división celular), en la cual la membrana nuclear desaparece y los cromosomas se sitúan en el plano ecuatorial de la célula.

ORGANELOS: diferentes estructuras contenidas en el citoplasma de las células, principalmente las eucariotas, que tienen una forma determinada. La célula procariota carece de la mayor parte de los orgánulos.

PROFASE: primera fase de la mitosis (división celular), en la cual se vuelven distinguibles los cromosomas.

TELOFASE: cuarta y última fase de la mitosis (división celular), en la cual se forman los dos nuevos núcleos y el citoplasma se divide en dos.

VERDADEROS POSITIVOS: el resultado de una prueba diagnóstica (exploración física o prueba complementaria) obtiene un valor de verdadero positivo (VP) cuando su conclusión indica una enfermedad determinada, y se confirma que el paciente realmente la está sufriendo.

RESUMEN

En el presente trabajo se plantea la concepción y desarrollo de una herramienta computacional capaz de detectar divisiones celulares en placas histológicas de Leiomioma, cáncer de mama y tumor estromal gastrointestinal (GIS) con el fin de disminuir los tiempos empleados en este proceso por los patólogos del Hospital Universitario del Valle Evaristo García (H.U.V).

Por medio de procesamiento digital de imágenes, específicamente procesamiento morfológico, se lograron detectar los núcleos de las células candidatas a mitosis y utilizando criterios de distancias entre centroides, área, perímetro, radio y redondez de células hijas, se procedió a clasificar las mismas. Al final la herramienta indica la cantidad de mitosis de una placa histológica y el porcentaje de sensibilidad asociada al tejido que se está analizando.

Palabras claves: cáncer de mama, conteo mitótico, división celular, GIS, leiomioma, mitosis, procesamiento digital de imágenes.

INTRODUCCIÓN

Este proyecto de grado tiene como principal propósito el diseño de una herramienta computacional que realice el conteo de las divisiones celulares que se encuentran en las placas histológicas con tres tipos de tejidos cancerígenos como lo son: Leiomioma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama. Actualmente en el Hospital Universitario del Valle Evaristo García (HUV) se realiza a través del microscopio el conteo mitótico de todas las muestras de biopsias y tejidos almacenados en placas histológicas a criterio visual del médico patólogo. El realizar el proceso de esta manera supone un margen de error elevado y además de que resulta tedioso y demorado, se debe contar con la revisión de mínimo tres médicos patólogos, para que la información pueda ser verificada y reportada al paciente.

Es importante optimizar estos tiempos de diagnóstico y brindar la información correspondiente al conteo ya que a través de este proceso se pueden realizar predicciones y pronósticos del cáncer, además de determinar los grados de diferenciación tumoral. El lograr realizar el diagnóstico a tiempo y con una sensibilidad asociada, disminuiría a largo plazo los altos índices de mortandad causados por el cáncer.^[1]

En la actualidad, mediante la ayuda de herramientas informáticas para procesamiento de imágenes se ha disminuido la complejidad del procedimiento, facilitando, en cierta medida la labor del médico patólogo. Desde 1998 hasta principios de 2013 se han propuesto algoritmos y análisis estadísticos para la detección de mitosis en imágenes digitales. Entre estas técnicas se encuentra el análisis de forma celular mediante Adobe Photoshop®, análisis de parámetros en la imagen y análisis por redes neuronales para determinar patrones biológicos.

En este proyecto se realizó la detección y el conteo de divisiones celulares de los tres casos de tumores mencionados anteriormente mediante el procesamiento digital de imágenes.

1. ANTECEDENTES

El proceso de conteo mitótico para la identificación del nivel de agresividad del cáncer se ha optimizado en años recientes, mediante la ayuda de herramientas informáticas y software de procesamiento de imágenes que disminuyen la complejidad del procedimiento y facilitan, en cierta medida, la labor del médico patólogo.

Una de las herramientas reconocidas para esta labor es el Photoshop ®, del desarrollador Adobe, que es empleado principalmente para clasificar los cariotipos mediante el recorte y posterior medición de las imágenes, determinando con ello las características anatómicas del núcleo. De igual manera, este software permite realizar apreciaciones de pigmentación y otras funciones asociadas al mejoramiento y manipulación de las imágenes^{1,2}. Aunque el uso del Photoshop incrementa los niveles de certidumbre del procedimiento, este aún depende de la apreciación del patólogo e incluye errores de carácter humano en el diagnóstico definitivo, por lo que no puede considerarse un procedimiento automatizado.

El primer acercamiento sobre el uso de procesamiento digital de imágenes para el análisis de placas histológicas fue en 1998, por Lars-Göran Sundblan, et al³ los cuales impulsaron el uso de análisis de imágenes y la automatización para medir el índice mitótico en meristemas apicales de coníferas. Para realizar una estimación del índice mitótico se utilizó una secuencia de procesamiento de imágenes estándar por análisis de parámetros en la imagen.

Sobre herramientas ya desarrolladas se encuentran las siguientes:

- F. Arámbula Cosío, et al⁴ en el 2001, desarrollaron una estación de trabajo basada en una red neuronal para el análisis automatizado de proliferación celular

¹ PALACIOS CALVO, José. Factores Anatopatológicos En El Cáncer De Mama, Grado Histológico. [En línea]. Madrid, España: Hospital Universitario de la paz. [consultado el 7 de Abril de 2014] Disponible en internet: <http://www.conganat.org/icomgreso/conferencias/014/grado.htm>

² MONTI, J.A., et al. Aplicación racional de nuevas tecnologías en función pronostica. En: Mastología dinámica. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A. 1995, p 61-69.

³ SUNDBLAN L, et al. The use of image analysis and automation for measuring mitotic index in apical conifer meristems. En: Journal of Experimental Botany, Vol. 49, No. 327, 1998, p 1749-1756.

⁴ ARÁMBULA F., et al. A neural network based workstation for automated cell proliferation analysis. En: Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Vol. 3. 2001, p 2567-2570.

en imágenes de microscopio citológicas. El software es utilizado como una herramienta del biotecnólogo para determinar la proliferación celular y aberraciones cromosómicas. El sistema calcula de manera automática el índice mitótico. Obtuvieron un acierto del 91 % en la clasificación de las metafases y los núcleos estimulados, obtenidos de 30 placas histológicas.

- En el 2012, In Ae Hur⁵ desarrolló y evaluó nuevos algoritmos de visión por computador para automatizar el análisis y la detección de eventos de células. El primer método detecta los eventos importantes dentro de una secuencia temporal mediante redes neuronales que clasifican dichos eventos en categorías predefinidas. El segundo y tercer método aplican técnicas estadísticas y econométricas para identificar células en mitosis. El último método determina la posición de las células con el fin de asociar a las células hijas con sus padres después de la mitosis mediante el filtro de Kalman. Los resultados obtenidos en el estudio muestran que los enfoques desarrollados pueden conducir a mejoras significativas con respecto a algoritmos existentes.

- Adnan M. Khan, Hesham El-Daly y Nasir M. Rajpoot⁶, en el 2012 propusieron un método estadístico (mezcla entre Gamma-Gaussiano) para la detección de mitosis en imágenes histológicas de cáncer de mama. Realizan un post- procesamiento con el fin de reducir falsos positivos. Los resultados que obtuvieron demuestran que este sencillo método resulta eficaz para detectar las células mitóticas en imágenes histológicas de cáncer de mamá.

- En el 2013, Humayun Irshad⁷, desarrolló un sistema para detectar de manera automática mitosis en histopatología usando características morfológicas y estadísticas multicanal. El método propuesto fue evaluado en imágenes histológicas de cáncer de mama; el modelo es simple pero robusto y demostró una alta efectividad en la captura de múltiples canales estadísticos para la detección de mitosis.

- Y finalmente el primer dispositivo que integra el análisis de imágenes para la observación de cultivos es la BioStation CT de Nikon que permite realizar experimentos de imágenes sin tener que retirar siquiera las células de la

⁵ IN AE HUR. Novel computer vision algorithms for automated cell event detection and analysis. Tesis de Doctorado. Iowa: University of Iowa. 2012. 210 p.

⁶ KHAN, AM., EL-DALY, H. y RAJPOOT, N.M. A Gamma-Gaussian mixture model for detection of mitotic cells in breast cancer histopathology images. En: 21st International Conference on Pattern Recognition (ICPR), 2012, p 149-152.

⁷ IRSHAD, H. Automated mitosis detection in histopathology using morphological and multi-channel statistics features. En: J Pathol Inform, Vol. 4, No. 10, 2013, p 4-10.

incubadora. Este dispositivo posee un software CL-Quant, el cual es un programa de análisis de imágenes de células vivas de última generación que permite a los científicos detectar, segmentar, medir, clasificar, analizar y descubrir automáticamente fenotipos celulares y subcelulares en sus experimentos de captura de imágenes de células vivas, tanto en campo claro (fase) como en fluorescencia de tres canales. El software permite realizar recuento celular, confluencia de células, medir la tasa de la división de las células y analizar subpoblaciones de células⁸.

Se concluye que hasta el momento se han desarrollado algoritmos y software integrados a equipos, que se encargan de desarrollar esta función, sin embargo a pesar de que existen no se han implementado en el Hospital Universitario del Valle debido a que ninguno de ellos ha sido puesto a prueba en muestras histológicas de población colombiana. Por ello, motivadas en la revisión de los antecedentes se observa que la implementación de un sistema de análisis de imágenes digitales es sencillo y rápido de efectuar para un ingeniero biomédico con el apoyo y verificación de un patólogo en muestras histológicas de población local y con proyección a ser extendida a nivel nacional. Con base en lo anterior se plantea desarrollar una herramienta de software que permita automatizar el proceso.

⁸ OBSERVACIÓN DE INCUBADORA DE CÉLULAS – Productos BioStation CT. Nikon Instruments Europe B.V. [en línea]. España: BioStation. [consultado: 31 de agosto de 2013]. Disponible en Internet: [http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Observacion-de-incubadora-de-celulas/BioStation-CT/\(key_features\)](http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Observacion-de-incubadora-de-celulas/BioStation-CT/(key_features)).

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La principal causa de muerte en la escala mundial es el cáncer^{9,10}. En el 2008 causó 7,6 millones de muertes (el 13 % del total aproximadamente). Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030¹. El cáncer es el resultado de la división celular fuera de control. La velocidad de ésta, determinará la agresión del tumor. Si se produce una mitosis lenta puede atribuirse una característica benigna a este, pero si por el contrario la mitosis es rápida el tumor será maligno¹¹; por lo tanto resulta importante realizar el conteo mitótico para determinar el grado de diferenciación tumoral. Para el médico patólogo saber este índice en los casos de tumores en músculo liso como lo es el Leiomioma, cáncer de mama y cáncer de estómago, supone una gran ventaja para determinar un diagnóstico acertado y realizar proyecciones de proliferación del mismo.

Los tipos de cáncer según su ubicación en el cuerpo humano, que encabezan las listas de índices de mortalidad, son el cáncer de mama y el cáncer de estómago. El cáncer de mama es el más frecuente en la población femenina ya que registra un 69 % de las defunciones en los países en vía de desarrollo y tiende a aumentar por la urbanización y la adopción de modelos occidentales¹². En las Américas los tumores estromales gastrointestinales que provocan cáncer de estómago afectan a 85 000 habitantes cada año, además se estiman 75 000 muertes por su causa¹³. Los Leiomiomas constituyen el 1 % de todas las neoplasias diagnosticadas al año y solo de un 25 a un 30 % son ubicados en el retroperitoneo¹⁴.

⁹ CÁNCER, DATOS Y CIFRAS. OMS. Centro de prensa. [en línea]. [consultado el 20 Mayo de 2013] Disponible en internet: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/.

¹⁰ PROGRAMAS INTERNACIONALES DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER. Instituto Nacional de cáncer de los institutos nacionales de la salud EE.UU. [en línea]. [consultado el 25 de Mayo 2013]. Disponible en internet: www.cancer.gov/espanol/instituto/prioridades/programas-mundiales.

¹¹ EL CÁNCER ASPECTOS BÁSICOS SOBRE SU BIOLOGÍA, CLÍNICA, PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. [en línea]. Bogotá D.C: Ministerio de Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología. [consultado el 28 de Mayo 2013]. Disponible en internet: <http://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Contenidos/cancer.html>

¹² Cáncer de mama: prevención y control. Temas de Salud. [en línea]. OMS. [consultado el 28 de Agosto 2013]. Disponible en internet: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index.html>.

¹³ GLOBOCAN 2008 (IARC). Pan American Health Organization, Health Information and Analysis Project. Regional Core Health Data Initiative. Washington DC, 2010.

¹⁴ FISHER, N. W. y NUTINSKY, C.L. Retroperitoneal leiomyosarcoma: a review of the literature. En: The Journal of the American Osteopathic Association, Vol. 89, No. 8, 1989 p 1058-1065.

Actualmente en el Hospital Universitario del Valle Evaristo García (HUV) el conteo de la división celular de muestras de tejido almacenadas en placas histológicas se realiza través del microscopio de acuerdo al criterio visual del patólogo, lo que puede incrementar el margen de error; este procedimiento resulta tedioso, demorado y requiere la revisión de por lo menos tres médicos patólogos para corroborar el número de divisiones celulares dadas en el tejido de muestra y reducir al mínimo la incertidumbre.

2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo puede realizarse el conteo mitótico para determinar el grado de diferenciación tumoral en placas histológicas de Leiomioma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama del Hospital Universitario del Valle Evaristo García (HUV), determinando el grado de sensibilidad y reduciendo el tiempo empleado en este proceso?

3. JUSTIFICACIÓN

El conteo mitótico se constituye como uno de los principales factores para estimar la proliferación y la agresividad de tumores, un paso crítico para la clasificación histológica del tipo de cáncer. En la práctica clínica, los patólogos realizan el conteo mitótico mediante un examen tedioso en el microscopio; para que este sea objetivo, la placa histológica con la muestra de tejido a analizar debe ser revisada por un mínimo de tres patólogos.

Entre los tipos de cáncer catalogados con mayor índice de mortalidad, según su incidencia en el cuerpo humano, están el cáncer de mama, el de estómago y los Leiomiomas; en estas tres patologías resulta importante hacer una revisión exacta del conteo mitótico, puesto que a partir de este resultado se establecerá su grupo de riesgo de malignidad. Estos tres tumores tienen en común la necesidad de poseer la información referente a esta proliferación de células de forma incontrolada. Sin embargo, existen estudios que indican que se presenta una certidumbre poco aceptable en la revisión del conteo mitótico.

Caso cáncer de mamá: se ha determinado la variabilidad en el diagnóstico dado por diferentes observadores del grado histológico de malignidad en el caso de un carcinoma ductal de mama¹⁵. Los médicos patólogos clasificaron los casos de forma individual sin conocer los diagnósticos de los demás, encontrando un porcentaje de coincidencia en estos de 36,47 % según el grado histológico. El pleomorfismo nuclear fue el aspecto que más influyó en el mismo⁷. Con lo anterior se puede deducir que la evaluación es altamente subjetiva y que agregado a esto, existe un porcentaje muy bajo de coincidencia de los diagnósticos arrojados por cada médico patólogo.

Caso tumores del estroma gastrointestinal: el tamaño tumoral y el conteo mitótico definen los factores pronósticos clínicos y patológicos para determinar su grupo de riesgo de malignidad. Una de las posibilidades para que el tumor sea de alto riesgo, sin importar las dimensiones que posea este, es si el conteo mitótico supera las 10 mitosis por campo¹⁶; por lo tanto en este tipo de patologías el conteo de divisiones celulares también debe ser acertado para garantizar un diagnóstico y tratamiento adecuado.

¹⁵ PUPO J., *et al.* Graduación Histológica de Malignidad en el Carcinoma Ductal Infiltrante de la Mama. *En*: 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2005, 6 p.

¹⁶ BÓRQUEZ, P. y NEVEU, C. Tumores del estroma gastrointestinal (GIST), un particular tipo de neoplasia. *En*: Revista médica de Chile, Vol. 136, No.7, 2008, p 921-929.

Caso Leiomioma: el recuento de mitosis es el elemento fundamental para el diagnóstico, en Leiomioma uterino más de 15 mitosis por 10 campos aumento mayor, son altamente agresivos y pueden generar metástasis¹⁷. Estos poseen mitosis atípicas y necrosis, que implica que los husos se hallarán anormalmente grandes en unas regiones y contrastados en otras.

Así, se infiere que el conteo mitótico realizado de forma analógica por los médicos patólogos demanda tiempo y costos innecesarios, además que el mismo debe ser corroborado por tres o más profesionales para obtener niveles de certidumbre aceptables, siendo estos poco confiables a pesar de las múltiples revisiones realizadas.

Este proyecto pretende diseñar una herramienta encargada de realizar el conteo de las divisiones celulares que se encuentran en placas histológicas con Leiomioma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama del Hospital Universitario del Valle Evaristo García (HUV), con el fin de determinar un nivel de sensibilidad en el diagnóstico y reducir el tiempo empleado en el proceso.

¹⁷ CHUAQUI R. Capítulo 6. Anatomía Patológica del Aparato Genital Femenino. [en línea]. [Consultado: 4 de Septiembre de 2013]. Disponible en internet: escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/anatomiapatologica/06Genital_fem/6cuerpo_uter2.html.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una herramienta de software basada en procesamiento digital de imágenes que permita realizar el conteo de divisiones celulares en placas histológicas con Leiomioma, tumor estromal gastrointestinal (GIS) y cáncer de mama, a 10 campos de 40x.

4.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

- Analizar la metodología de conteo del número de mitosis presentadas en una placa histológica utilizada en el H.U.V para definir los requerimientos según la metodología UML.
- Diseñar una herramienta de software con base en la metodología de desarrollo UML obteniendo la matriz de comparación por pares entre las diferentes técnicas para lograr el conteo de mitosis en las placas histológicas.
- Seleccionar la plataforma de programación adecuada para implementar un sistema que agilice el conteo de mitosis que se encuentran en una placa histológica.
- Desarrollar una herramienta de software capaz de detectar el núcleo de las células que se encuentran en la placa histológica basada en algoritmos de procesamiento digital de imágenes.
- Validar la efectividad de la herramienta de software diseñada mediante una comparación con la metodología empleada por los patólogos del H.U.V.

5. MARCO REFERENCIAL

5.1 ALCANCES

A través de este trabajo de grado se pretende brindar una herramienta de apoyo al análisis de imágenes médicas a los médicos patólogos del Hospital Universitario del Valle para sus diagnósticos en cáncer de mama, G.I.S y Leiomiosarcoma. Se establecieron parámetros de exclusión e inclusión para la extracción de los fotogramas de los videos, siendo usados en el posterior procesamiento digital y detección de mitosis.

Esta herramienta se desarrolló bajo conceptos de pre procesamiento básico de imágenes, sobre fotos en formato JPEG, cada una con un peso aproximado de 1,2 kb extraídas de los videos tomados en la unidad de patología del Hospital. La herramienta diseñada arroja al final del procesamiento el número de mitosis detectada y la cantidad de mitosis falsas positivas al igual que una serie de imágenes que le permitirán al patólogo, visualizar la imagen original y la imagen donde detecta los núcleos en fase mitótica.

5.2 LIMITACIONES

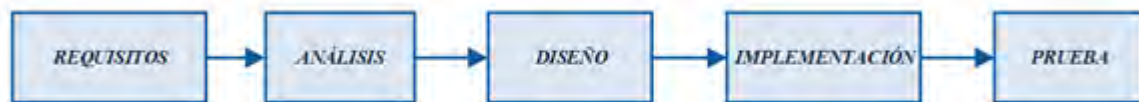
Realizar análisis en imágenes de la gama de colores púrpura y rosado, fue la principal limitante, puesto que luego para el procesamiento estas se escalaron a niveles de grises. Esto ocurre a raíz de que la tinción usada para las placas trabajadas se compone de eosina-hematoxilina (H&E) y está especializada para análisis básico de morfología en la célula, dentro de la detección de patologías.

Los procesamientos con análisis de color en placas histológicas, se denominan pruebas inmunohistoquímicas, con las cuales no cuenta el Hospital Universitario del Valle. Por tanto el análisis fue tratado desde las características morfológicas de la célula y su material celular, y solo con un aspecto de color, que fue tomado en cuenta en los procesos de umbralización de la imagen.

5.3 METODOLOGÍA

Se plantea para la investigación propuesta en este proyecto una metodología fundamentada en los siguientes conceptos:

Figura 1. Metodología UML para desarrollo de software



Fuente: ACOBSON I, BOOCH G, RUMBAUGH J. El proceso unificado de desarrollo de software. Madrid: Pearson educación S.A, 2000, p. 11.

5.3.1 Requisitos. Fundamentada en un proceso de revisión bibliográfica y visitas al departamento de patología del Hospital Universitario del Valle Evaristo García, se analizó el proceso utilizado para obtener el índice mitótico de una muestra de tejido que se encuentra en una placa histológica.

Con el fin de obtener los requisitos y restricciones que debe tener la herramienta de software se siguió el siguiente esquema de trabajo:

Cuadro 1. Requisitos y Artefactos

Trabajo a realizar	Artefactos resultantes
Enumerar los requisitos candidatos	Lista de características
Comprender el contexto del sistema	Modelo del dominio
Capturar los requisitos funcionales	Modelo de casos de uso
Capturar los requisitos no funcionales	Requisitos adicionales o casos de uso concretos (para requisitos específicos de un caso de uso)

Para capturar los requisitos de manera eficaz, se trabajaron los artefactos expuestos en el cuadro 1, donde se relacionan los requisitos dados por el usuario con los artefactos empleados para diseñar el software.

Algunos **requisitos** que debe tener la herramienta de software son:

- Disminuir el tiempo empleado en el proceso del conteo de mitosis.
- Determinar la sensibilidad del conteo de las divisiones celulares según el tipo de cáncer.
- Contar el número de mitosis con aumento de 40X en 10 campos de muestra.

5.3.2 Análisis. En esta etapa se refinan los requisitos dados por el departamento de patología del H.U.V, con el fin de estructurarlos para facilitar la comprensión, preparación, modificación y conversión en especificaciones de funcionamiento.

Las especificaciones de funcionamiento una vez expresadas en lenguaje de desarrollo permitirán dar una vista interna respecto a la arquitectura de la herramienta computacional a desarrollar, con lo que se dispone así los insumos para comenzar la etapa del diseño de la misma.

Con la información de las especificaciones de funcionamiento para realizar un conteo de división celular válido, se procederá a desarrollar la plataforma sistemática en MatLab, a través de la metodología UML para proyectos.

5.3.3 Diseño. Una vez identificadas y estructuradas las especificaciones y restricciones de la etapa de análisis, se procede a diseñar la herramienta computacional fundamentada en su diagrama UML.

Para esto se utilizó como base algorítmica las técnicas de procesamiento digital de imágenes. A partir de aquí, se desarrollaron estrategias para realizar el conteo automático de divisiones celulares, tales como: detección de bordes, reconocimiento de patrones, entre otras.

5.3.4 Implementación. Después de tener una estrategia algorítmica definida, se implementaron los siguientes pasos:

- Digitalizar las placas histológicas con casos de Leiomioma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama; la adquisición de las imágenes se llevó a cabo mediante una cámara HD disponible en la sala de residentes de patología en el HUV, la cual realiza la captura de fotos y videos teniendo en cuenta que la iluminación es expedida por un bombillo halógeno perteneciente a microscopio de luz de 6V/30W.

- Aplicar sobre las placas histológicas digitalizadas un pre-procesamiento, con el fin de eliminar el ruido que poseen estas y resaltar los núcleos de las células.

- Se realizaron dentro del programa una etapa de segmentación de las placas histológicas para facilitar el análisis de la división celular.

- Con las imágenes digitales segmentadas, se extraerán características cuantitativas de las células con el fin de diferenciar entre el núcleo y las otras partes de las mismas.

- Se implementaron una interfaz gráfica en la cual los médicos patólogos del H.U.V podrán interactuar con el programa.

5.3.5 Pruebas. En esta etapa se verificó el correcto funcionamiento de la herramienta de software, comparando los resultados del índice mitótico dado por el programa y el obtenido por el patólogo mediante el microscopio y su criterio visual, ajustando debidamente el programa para asociar una sensibilidad en la medida y agilizar del proceso.

5.4 MARCO TEÓRICO

El análisis de placas histológicas es indispensable para dar diagnósticos de enfermedades neoplásicas, estas enfermedades se relacionan principalmente con tumores malignos, donde sucede un crecimiento celular descontrolado con la capacidad de invadir y diseminarse rápidamente⁵.

Las técnicas actuales para realizar estudios histopatológicos en pacientes que poseen algún tipo de tumor, implican la necesidad de calcular el grado de

diferenciación tumoral para evaluarlo dentro de los factores de pronóstico del cáncer que se desarrolla¹⁸.

5.4.1 Grado de diferenciación tumoral. La identificación de los factores predictivos de un tumor determina, en cada uno, si este es benigno o maligno, qué tipo y subtipo histológico tiene, su grado de diferenciación histológica y el estado en el que se encuentra. Esto permitió establecer el comportamiento biológico de la neoplasia, la sobrevida del paciente y la recidiva¹⁹.

El grado de diferenciación tumoral que pertenece a estos factores predictivos, establece el nivel de agresión clínico-biológica de una neoplasia maligna. En este se evalúan tres parámetros: el grado de diferenciación histológica o tisular, el grado de pleomorfismo nuclear y el conteo mitótico¹⁹.

5.4.1.1 Diferenciación histológica. Consiste en identificar el grado de diferenciación del tumor, es decir, evaluar la similitud de las células cancerosas con las células saludables en el mismo tipo de tejido, tanto en apariencia como en función. Normalmente se tiende a describir el nivel de diferenciación del tumor en cuatro (4) grados de severidad: G1, G2, G3 y G4. Los tumores altamente diferenciados o de bajo grado son catalogados como G1, los cuales representan en el conteo mitótico una baja tasa. Por otra parte, los tumores con diferenciación nula o de alto grado son catalogados como G3 o G4²⁰.

5.4.1.2 Pleomorfismo nuclear. Hace referencia a la anatomía tumoral, su tamaño, forma y distribución de la cromatina en el núcleo y los nucléolos. Este se valora en relación a cómo varían la forma y el tamaño de los núcleos neoplásicos en comparación con lo normal. La irregularidad de los contornos nucleares, el número y tamaño del nucléolo se evalúan como características adicionales²¹.

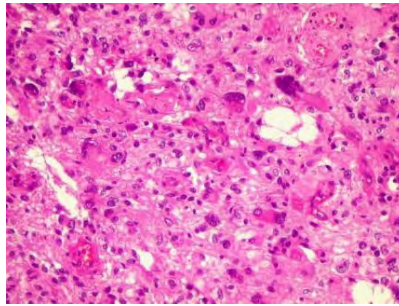
¹⁸ MÉNDEZ, C. y CARAMAGO, C. H. Patología humana básica aplicada a rehabilitación. Bogotá D.C.: Centro Editorial Universidad del Rosario. 2002, p 213 - 216.

¹⁹ QUADE G. Grado histológico del tumor. [en línea]. Bonn, Alemania: MedNews – NATIONAL CANCER INSTITUTE. University of Bonn, Medical Center. [consultado 02 de Abril de 2013]. Disponible en internet: <http://www.meb.uni-bonn.de/cancernet/spanish/600059.html>

²⁰ MAHIQUES A., Grado histológico del tumor. Sistemas de gradación de los tumores. [en línea]. Clínica Virgen del Consuelo. [consultado el 30 de Mayo 2013]. Disponible en internet: http://www.arturomahiques.com/estadios_quirurgicos.htm

²¹ ARIAS L.A, INDY J.J, AHUMADA R.I, BARRAGÁN H. Caracterización careotípica en mitosis y meiosis del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). [en línea]. [consultado el 2 de Octubre de 2013]. Disponible en internet: <http://www.biologiatropical.ucr.ac.cr/attachments/volumes/vol59-2/12-Arias-Characterizacion.pdf>

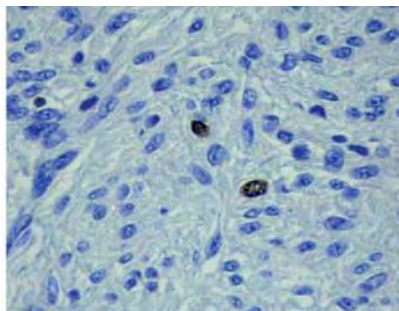
Figura 2. Placa histología con pleomorfismo nuclear



Fuente: DONGMEI, C., *et al.* Atlas of Histology with functional & clinical correlations. China: Lippincott Williams & Wilkins. 2011, 496 p.

5.4.1.3 Índice mitótico. Se basa en contar el número de acontecimientos mitóticos por campo en el microscopio a cierta distancia, a partir de este se obtiene junto con los factores anteriores la gradación del tumor, se tiene en cuenta la anatomía mitótica de tipo normal y anormal. Se debe diferenciar un evento de mitosis y núcleos picnóticos en apoptosis.^{10, 11, 20}. La dificultad de esta evaluación es el consumo de horas del patólogo, frente al costo resultante de ese conteo, actualmente se emplean metodologías matemáticas para determinar el número de mitosis pero ninguna está validada²².

Figura 3. Placa histología con mínima actividad mitótica



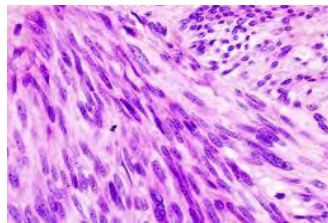
Fuente: DONGMEI, C., *et al.* Atlas of Histology with functional & clinical correlations. China: Lippincott Williams & Wilkins. 2011, 496 p.

²² Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. [consultado el 2 de Octubre de 2013]. Disponible en internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358857>

5.4.2 Procesamiento digital de imágenes (PDI). Conjunto de técnicas que se aplican a imágenes digitales con el fin de mejorar la calidad o facilitar la búsqueda de la información. Las etapas fundamentales de PDI son la adquisición, el pre-procesamiento, la segmentación y la extracción de características²³.

5.4.2.1 Adquisición. Etapa en la cual se obtienen imágenes digitales utilizando un dispositivo de captura como cámara digital, escáner, satélite, cámara de video, entre otros. Para el desarrollo de este proyecto fue necesario emplear una cámara digital, con la cual se buscó obtener la señal digitalizada. Se debió diseñar un protocolo para que la adquisición de las imágenes fuera adecuada para la aplicación controlando factores como iluminación, enfoque, encuadre de la imagen, teniendo en cuenta el tipo de calibración y su adecuada captura al inicio de cada toma.

Figura 4. Placa histología con tumor estromal gastrointestinal (GIS)

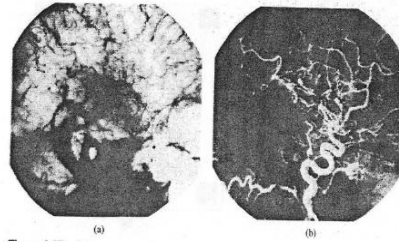


Fuente: DONGMEI, C., *et al.* Atlas of Histology with functional & clinical correlations. China: Lippincott Williams & Wilkins. 2011, 496 p.

5.4.2.2 Pre-procesamiento. En esta etapa el objetivo fue resaltar componentes de la imagen que son de interés y eliminar o reducir las que no son de interés (tales como ruido). Se espera que después del pre-procesamiento la imagen sea lo más apta posible para las etapas posteriores del procesamiento.

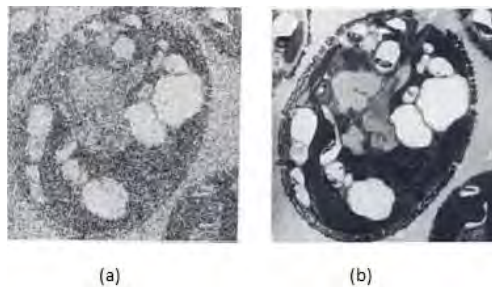
²³ JACOBSON I, BOOCH G, RUMBAUGH J. El proceso unificado de desarrollo de software. Madrid: Pearson educación S.A, 2000, 438 p.

Figura 5.Mejora de una imagen por sustracción: (a) Imagen original; (b) imagen (después de la inyección del colorante en el torrente sanguíneo)



Fuente: GONZALEZ, R. C. y WOODS, R. E. Digital image processing. 3 Ed. Estados Unidos: Prentice Hall, 2007, 976 p.

Figura 6. Reducción del ruido de una imagen: (a) Imagen original; (b) imagen modificada (después aplicar filtro mediana para eliminar ruido)



Fuente: GONZALEZ, R. C. y WOODS, R. E. Digital image processing. 3 Ed. Estados Unidos: Prentice Hall, 2007, 976 p.

5.4.2.3 Segmentación. Esta etapa consiste en partir una imagen de entrada en sus partes constituyentes u objetos, fundamentalmente se busca el reconocimiento de caracteres. Al finalizar este proceso se tienen los datos que constituyen bien el contorno de una región o todos los puntos de una región determinada. En cada caso es necesario convertir los datos a una forma adecuada para el procesamiento por computadora y se deben tomar decisiones respecto a la representación de los datos, como un contorno o como una región completa.

La representación como la de un contorno es adecuada cuando el interés radica en las características de la forma exterior, como esquinas o inflexiones. La

representación regional es la adecuada cuando el interés se centra en propiedades internas, como la textura o la estructuración. En algunos casos ambas representaciones existen. Esto ocurre en las aplicaciones para reconocimiento de caracteres, que requieren algoritmos basados en la forma de los bordes, así como la estructuración y otras propiedades internas.

También debe especificarse un método para describir los datos de forma que se resalten los rangos de interés. La selección de rasgos consiste en extraer con información cuantitativa en interés o que sea fundamental para diferenciar una clase de objetos de otra.

En el proceso de reconocimiento se asigna una etiqueta a un objeto basándose en información proporcionada por sus descriptores. Finalmente la interpretación implica asignar significados a un conjunto de objetos reconocidos. (Gonzalez & Woods, 2002).

- **Técnicas de segmentación:** Para el proceso de segmentación existen varias técnicas especializadas de segmentación como la umbralización, detección de fronteras y/o bordes, agrupamientos de píxeles y análisis de textura entre otras (Ospina P & Urrea D, 2002) (Universidad politécnica de Madrid, 2005).
- **La segmentación por fronteras y/o bordes:** Está fundamentada en el aislamiento, detección o comparación de características geométricas, como en el caso de los operadores erosión y dilatación, que son además operadores que fundamentan la morfología matemática (Marqués, 1992) (Zamora Ortiz, 2002) (Chan & Shen, 2005).
- **Extracción de características:** Se ocupa de extraer información cuantitativa de los elementos constitutivos de interés de la imagen con el fin de estar en capacidad de diferenciar entre clases. Los elementos de interés pueden ser externos (cuando el objetivo se centra en características de forma) o internos (cuando el objetivo se centra en características de color, nivel de gris y textura).

6. DESARROLLO DEL SISTEMA

6.1 DETERMINACIÓN DE LAS NECESIDADES DE LOS MÉDICOS PATÓLOGOS

Para poder indagar sobre las necesidades de los médicos especializados en patología del H.U.V de Cali, al momento de detectar patologías en placas histológicas de pacientes con cáncer, se realizó una reunión con el director del banco de sangre el Dr. Armando Cortés Buelvas, quien nos manifestó diversos aspectos sobre el aporte que podría tener el desarrollar una herramienta en este campo y cuyos puntos más específicos se postulan en la siguiente tabla.

Cuadro 2. Tabla de determinación de las necesidades del médico patólogo

NECESIDAD DEL MÉDICO	NECESIDAD REAL
“Tardamos alrededor de 10 minutos aproximadamente analizando una placa histológica”.	La herramienta no deberá tardar más de 10 minutos analizando una placa.
“Nos resulta difícil identificar las mitosis y hacer análisis de forma en las placas histológicas de Leiomiomasarcoma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama”.	Basar las pruebas de la herramienta a desarrollar en las placas histológicas de Leiomiomasarcoma, Tumor estromal Gastrointestinal y cáncer de mama.
“Las mitosis se tienden a confundir a veces con los linfocitos y con células en necrosis y en apoptosis”.	Desarrollar un patrón a través de la herramienta que detecte solo mitosis, elimine los linfocitos y las células que están muriendo.
“Deberíamos poder analizar la imagen que deseemos y en la cual tengamos dudas, para saber si hay la suficiente cantidad de mitosis y determinar si hay cáncer”.	La herramienta deberá arrojar la cantidad de mitosis por campo que pueda identificar.
“Deberíamos poder tener herramientas sobre la imagen fáciles de usar, para nosotros poder analizar mejor si hay mitosis o no”.	Implementar en la herramienta, elementos que ayuden al médico a procesar mejor la imagen y dar más certeza al diagnóstico.

De lo anterior se puede establecer la necesidad de desarrollar una herramienta computacional que les permita realizar el conteo de mitosis en placas histológicas de Leiomiomasarcoma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama, desarrollada para los médicos patólogos del Hospital Universitario Evaristo García de Cali. De las anteriores manifestaciones que ellos realizaron se pueden determinar objetivos y requerimientos técnicos para poder desarrollar la herramienta, por lo tanto se desarrolla una matriz de evaluación en la cual se determinan los requisitos que debe tener la plataforma a desarrollar.

Tabla 1. Requerimientos y objetivos de la herramienta computacional

REQUERIMIENTOS DE LA HERRAMIENTA
Portable.
Fácil Uso
Rápida
Agradable visualmente
Fácil mantenimiento
Resultados numéricos y de imagen de las mitosis

OBJETIVOS DE LA HERRAMIENTA
Se pueda usar en cualquier computador.
Posea herramientas para análisis de imagen.
Reduzca los tiempos de conteo.
Aumente la confiabilidad.

De las anteriores tablas se generaron las posibles especificaciones técnicas que pueden hacer cumplir con los objetivos del software. Se evaluaron para saber cuáles satisfacían las necesidades y objetivos a cumplir para el desarrollo de esta herramienta y se obtuvo la matriz del Cuadro 3.

Cuadro 3. Matriz QFD de evaluación de restricciones técnicas y requerimientos

NECESIDADES DEL CLIENTE	Prioridades.	Poco espacio de almacenamiento.	Entorno interactivo.	Plataforma de programación que proporcione métodos de cálculo numérico avanzado.	Plataforma de programación que proporcione métodos de procesamiento digital de imagen.	Sistemas operativos múltiples.		
Portable	3	9		3		9	63	18,975904
Fácil uso	5	3	9		3		75	22,590361
Rápida	4	9					36	10,843373
Agradable visualmente	1		9		3		12	3,6144578
Fácil mantenimiento	2	1			9	9	38	11,445783
Resultados numéricos y de imagen	6			9	9		108	32,53012
	21	80	54	63	90	45	332	100
	%	24,1	16	18,97590361	27,10843373	13,55	100	

La anterior matriz evidencia las especificaciones técnicas que se requiere tener para satisfacer las necesidades de la herramienta a desarrollar, que se encargará de realizar el conteo del número de mitosis en una placa histológica con Leiomiomasarcoma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama. El criterio técnico que más satisface a las necesidades del médico corresponde al de contar con una plataforma de programación que proporcione métodos de procesamiento digital de imagen con un 27.11 %. Existen plataformas y entornos de programación que contienen funciones para el procesamiento digital de imágenes y que facilitan mucho la elaboración de algoritmos para este tipo de aplicaciones y sobre todo a cumplir con el principal requerimiento del médico y es el de presentar la cantidad numérica final de divisiones celulares y la de exponer una imagen como resultado de este proceso de tipo histológico.

Los criterios técnicos de poco almacenamiento de espacio 24.1 % y la plataforma de programación que proporcione métodos de cálculo numérico avanzado 18,97 % garantizan que las necesidades de que sea fácil de usar y ser tipo portable y de fácil almacenamiento se cumplan, puesto que el que la plataforma no sea muy pesada en su desarrollo, hará que se ocupe menos espacio de almacenamiento y a la vez hará que el programa desempeñe su función más rápido.

Se presenta a raíz de lo determinado con la matriz QFD la evaluación de las alternativas de las plataformas en las cuales se podría desarrollar la herramienta:

Cuadro 4. Lenguajes de programación y especificaciones técnicas

LENGUAJES DE PROGRAMACIÓN	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS
JAVA	<ul style="list-style-type: none"> - “Se ha diseñado para permitir el desarrollo de aplicaciones portátiles de alto rendimiento para la mayor gama posible de plataformas informáticas. - Funciona con las principales plataformas de Hardware y sistemas operativos. - Constituye uno de los entornos de programación más rápidos, gracias a tecnologías de equipos virtuales de interpretación dinámica”.²⁴
C ++	<ul style="list-style-type: none"> - “Es un lenguaje orientado a objetos. - Permite realizar desarrollo a sistemas móviles, embebidos y de computadores.”²⁵
PYTHON	<ul style="list-style-type: none"> - “Es un lenguaje multiparadigma que permite programar con diversos estilos. - Facilita la programación a través de métodos de tipado dinámico. - Útil para desarrollos web y computadoras”.²⁶
MATLAB	<ul style="list-style-type: none"> - “Lenguaje de alto nivel para el cálculo numérico, visualización y desarrollo de aplicaciones. - Posee funciones matemáticas para álgebra lineal, estadísticas, análisis en Fourier, filtrado, optimización e integración numérica. - Herramientas para la creación de aplicaciones con interfaces personalizadas. - Herramientas para mejorar la calidad del código, da facilidad de mantenimiento y maximiza el rendimiento de la máquina”.²⁷

²⁴ Características y ventajas de JAVA. [en línea]. ORACLE, [Consultado el 10 de Abril de 2014]. Disponible en internet: <http://www.oracle.com/es/technologies/java/features/index.html>.

²⁵ STROUSTRUP, B. The C++ programming Language. 3 Ed. New Jersey: Murray Hill. 1997, 869 p. ISBN 0201889544.

²⁶ Apunte sobre Phyton. [En línea]. PHYTON. [consultado el 10 de Abril de 2014]. Disponible en internet: <https://www.python.org/about/quotes/>.

²⁷ Products Description – Key Features. [en línea]. MATHWORKS. [consultado el 10 de Abril de 2014]. Disponible en internet: <http://www.mathworks.com/products/matlab/description1.html>.

Una vez descritas las anteriores características técnicas se pasó a desarrollar la matriz de comparación por pares entre criterios que establecer la prioridad del criterio que más se deseaba cumplir.

Cuadro 5. Matriz de comparación por pares ponderada

CRITERIOS	Portable	Fácil Uso	Rápido	Agradable Visualmente	Fácil mantenimiento	Resultados numericos	TOTAL	PRIORIDAD
Portable	0,054945	0,020547945	0,0258	0,2	0,033613445	0,097560976	0,4324	0,07207344
Fácil Uso	0,274725	0,102739726	0,3093	0,2	0,033613445	0,097560976	1,0179	0,16965296
Rápido	0,21978	0,034246575	0,1031	0,2	0,403361345	0,097560976	1,058	0,17634032
Agradable Visualmente	0,010989	0,020547945	0,0206	0,04	0,025210084	0,097560976	0,2149	0,0358211
mantenimiento	0,164835	0,308219178	0,0258	0,16	0,100840336	0,12195122	0,8816	0,14693652
Resultados numéricos	0,274725	0,51369863	0,5155	0,2	0,403361345	0,487804878	2,3951	0,39917567
	1	1	1	1	1	1	6	1

Se logra establecer con la anterior tabla que el criterio que más se desea satisfacer es el de Resultados numéricos y de imagen, como se pensaba al inicio según la matriz QFD, por lo tanto a través de la evaluación de las plataformas nombradas anteriormente se decidirá a través de una evaluación AHP (Análisis Jerárquico) cuál plataforma elegir.

Cuadro 6. Matriz de evaluación por pares ponderada de las alternativas para desarrollar la herramienta. (Agrupadas por criterio)

PORTABLE	JAVA	C++	PHYTON	MATLAB	TOTAL	PRIORIDAD
JAVA	0,61	0,444	0,27273	0,765306	2,0885	0,52213461
C++	0,12	0,089	0,36364	0,030612	0,6043	0,1510874
PHYTON	0,15	0,022	0,09091	0,05102	0,3157	0,07891672
MATLAB	0,12	0,444	0,27273	0,153061	0,9914	0,24786127
	1	1	1	1	4	1

RÁPIDO	JAVA	C++	PHYTON	MATLAB	TOTAL	PRIORIDAD
JAVA	0,083	0,073	0,16667	0,02439	0,347	0,08677938
C++	0,25	0,218	0,16667	0,4878	1,123	0,28066334
PHYTON	0,25	0,655	0,5	0,36585	1,77	0,44259978
MATLAB	0,417	0,055	0,16667	0,12195	0,76	0,1899575
	1	1	1	1	4	1

FÁCIL USO	JAVA	C++	PHYTON	MATLAB	TOTAL	PRIORIDAD
JAVA	0,15	0,387	0,25	0,125	0,914	0,22849888
C++	0,04	0,097	0,25	0,125	0,5097	0,12743722
PHYTON	0,05	0,032	0,08333	0,125	0,2912	0,07280608
MATLAB	0,76	0,484	0,41667	0,625	2,285	0,57125783
	1	1	1	1	4	1

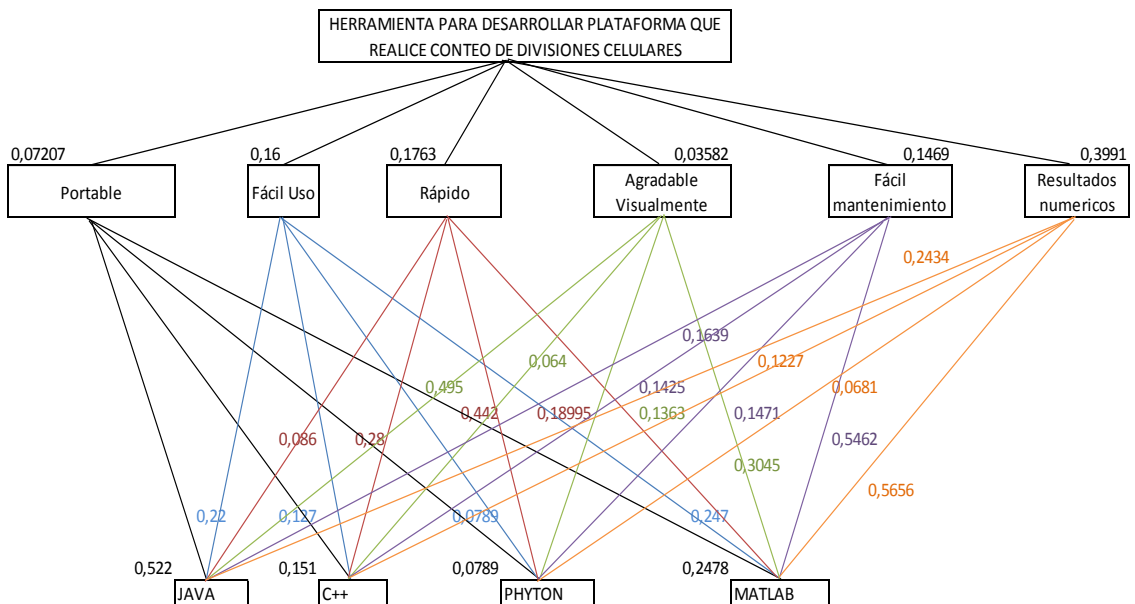
AGRADO VISU	JAVA	C++	PHYTON	MATLAB	TOTAL	PRIORIDAD
JAVA	0,561	0,357	0,32143	0,74074	1,98	0,49501496
C++	0,112	0,071	0,03571	0,03704	0,256	0,06408236
PHYTON	0,187	0,214	0,10714	0,03704	0,545	0,13634537
MATLAB	0,14	0,357	0,53571	0,18519	1,218	0,30455731
	1	1	1	1	4	1

MANTENIN	JAVA	C++	PHYTON	MATLAB	TOTAL	PRIORIDAD
JAVA	0,11	0,387	0,03571	0,125	0,6559	0,16397979
C++	0,03	0,097	0,32143	0,125	0,5702	0,14255745
PHYTON	0,32	0,032	0,10714	0,125	0,5887	0,14718131
MATLAB	0,54	0,484	0,53571	0,625	2,1851	0,54628145
	1	1	1	1	4	1

RESULTADOS	JAVA	C++	PHYTON	MATLAB	TOTAL	PRIORIDAD
JAVA	0,154	0,387	0,30769	0,125	0,974	0,24340881
C++	0,038	0,097	0,23077	0,125	0,491	0,12275124
PHYTON	0,038	0,032	0,07692	0,125	0,273	0,06816067
MATLAB	0,769	0,484	0,38462	0,625	2,263	0,56567928
	1	1	1	1	4	1

De las anteriores tablas se puede enfatizar que Matlab y JAVA se destacaron entre las 4 plataformas y lenguajes de programación seleccionados. Para lograr determinar definitivamente la selección de la herramienta se muestra a continuación la evaluación APH.

Figura 7. Proceso de análisis Jerárquico (AHP)



Cuadro 7. Resultados del AHP, para elección de herramienta computacional

RESULTADOS	
JAVA	0,231
C++	0,154
PHYTON	0,150
MATLAB	0,465

Para el análisis del anterior AHP, se tuvieron en cuenta cuatro opciones de herramientas posibles evaluadas mediante los criterios pedidos por el médico, de estos se destaca con un 40 % de relevancia el de brindar resultados numéricos y de imagen de la cantidad del mitosis al patólogo, seguido por que sea una herramienta rápida con un 18 %, que sea fácil de usar un 0,16 %, que pueda ser de fácil mantenimiento con un 14,69 % de relevancia, que sea de carácter portable 7,2 % y que la interfaz gráfica sea agradable visualmente se lleva el 3,58 % de relevancia para las restricciones.

Por otra parte en la tabla de resultados se logra observar que la plataforma de solución que satisface en mayor medida los criterios ya mencionados es la de MatLab con un 46,5%, por tanto la herramienta será desarrollada en dicho programa.

6.1.1 Elección de la técnica de procesamiento para la elaboración de la herramienta. La elección de la herramienta se trabajó con el mismo esquema anterior solo que para este se establecieron tres objetivos y tres herramientas posibles consideradas a satisfacer estos requerimientos. Estas son que sea de rápido procesamiento, que detecte patrones morfológicos y que sean fáciles de variar los parámetros para ajustar la herramienta.

Cuadro 8. Matriz de comparación por pares ponderada de la técnica de procesamiento

OBJETIVOS	Rápido procesamiento	Detección de patrones morfológicos	Fácil Variabilidad de parámetros	TOTAL	PRIORIDAD
Rápido procesamiento	0,1875	0,1666	0,375	0,7292	0,24305
Detección de patrones morfológicos	0,7500	0,6666	0,500	1,9167	0,63888
Fácil Variabilidad de parámetros	0,0625	0,1666	0,125	0,3542	0,11805

Se logra establecer con la anterior tabla que el criterio que más se desea satisfacer es el de detectar los patrones morfológicos ya que de esto se trata la herramienta, por lo tanto a través de la evaluación de las técnicas nombradas anteriormente se decidirá a través de una evaluación AHP (Análisis Jerárquico) cuál elegir.

Cuadro 9. Matriz de evaluación por pares ponderada de las alternativas para implementar una técnica de procesamiento digital. (Agrupadas por criterio)

Rápido procesamiento	Redes Neuronales	Procesamiento Morfológico	Estadísticas multicanal	TOTAL	PRIORIDAD
Redes Neuronales	0,1579	0,1429	0,3333	0,6341	0,2114
Procesamiento Morfológico	0,7895	0,7143	0,5556	2,0593	0,6864
Estadísticas multicanal	0,0526	0,1429	0,1111	0,3066	0,1022
	1	1	1	3	1

Detección de patrones morfológicos	Redes Neuronales	Procesamiento Morfológico	Estadísticas multicanal	TOTAL	PRIORIDAD
Redes Neuronales	0,6	0,714	0,333	1,648	0,549
Procesamiento Morfológico	0,2	0,238	0,556	0,994	0,331
Estadísticas multicanal	0,20	0,05	0,11	0,3587	0,11957672
	1	1	1	3	1

Fácil Variabilidad de parámetros	Redes Neuronales	Procesamiento Morfológico	Estadísticas multicanal	TOTAL	PRIORIDAD
Redes Neuronales	0,158	0,143	0,333	0,634	0,211
Procesamiento Morfológico	0,789	0,714	0,556	2,059	0,686
Estadísticas multicanal	0,05	0,14	0,11	0,3066	0,102199944
	1	1	1	3	1

De las anteriores tablas se puede enfatizar que el procesamiento morfológico y las redes neuronales se destacaron entre las 3 técnicas para el desarrollo de la herramienta. Para lograr determinar definitivamente la selección de la herramienta se muestra a continuación la evaluación AHP.

Cuadro 10. Resultado de la elección de la técnica a implementar con AHP

RESULTADOS	
Redes Neuronales	0,42721
Procesamiento Morfológico	0,45949
Estadísticas multicanal	0,11330

Para el análisis del anterior AHP, se tuvieron en cuenta tres opciones de técnicas de procesamiento posibles evaluadas mediante los criterios útiles para la elaboración del algoritmo, de estos se destaca con un 46 % de relevancia la de

usar procesamiento morfológico, seguido por la posibilidad de usar redes neuronales con un 43 % y por último las técnicas de estadística multicanal un 11,3 %. Por tanto la herramienta será desarrollada con dicha técnica que obtuvo el mayor porcentaje.

6.1.2 Caso de uso y diagrama UML. A continuación se presenta el diagrama de casos de uso en donde se representa la interacción de los actores (Herramienta computacional y Médico Patólogo) y el diagrama UML que es en donde se representan las variables y métodos a desarrollar en el software y los parámetros que se requerirán para que desempeñe la función deseada.

Figura 8. Diagrama de casos de uso

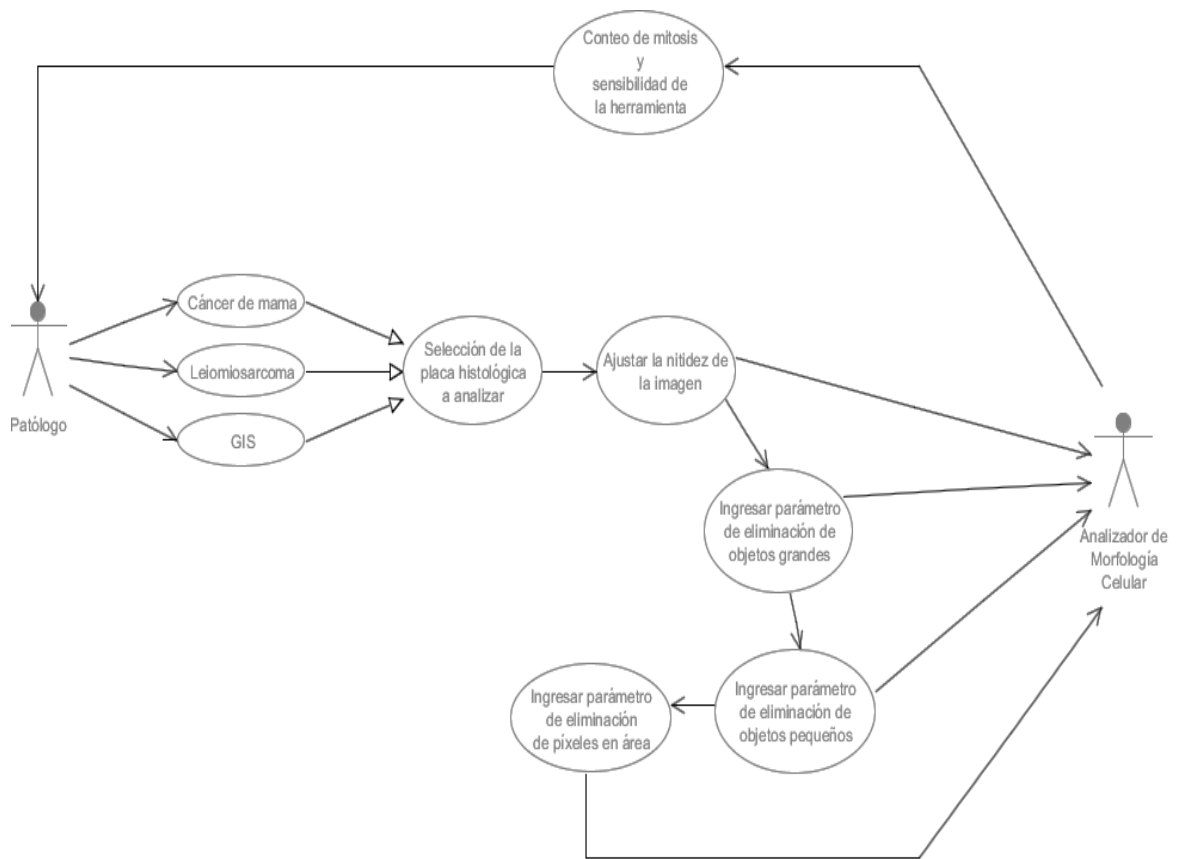
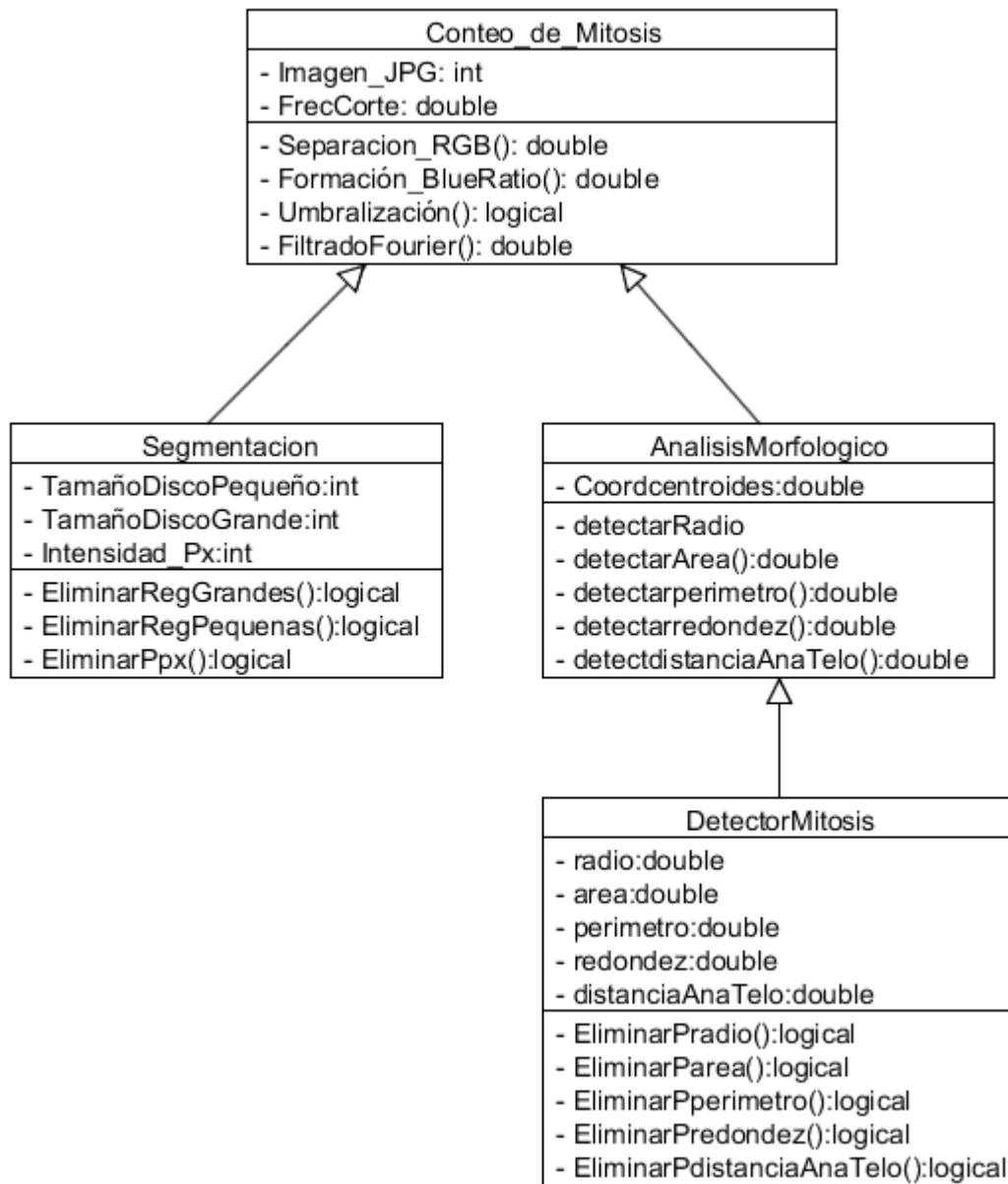


Figura 9. Diagrama UML de la plataforma encargada de contar mitosis



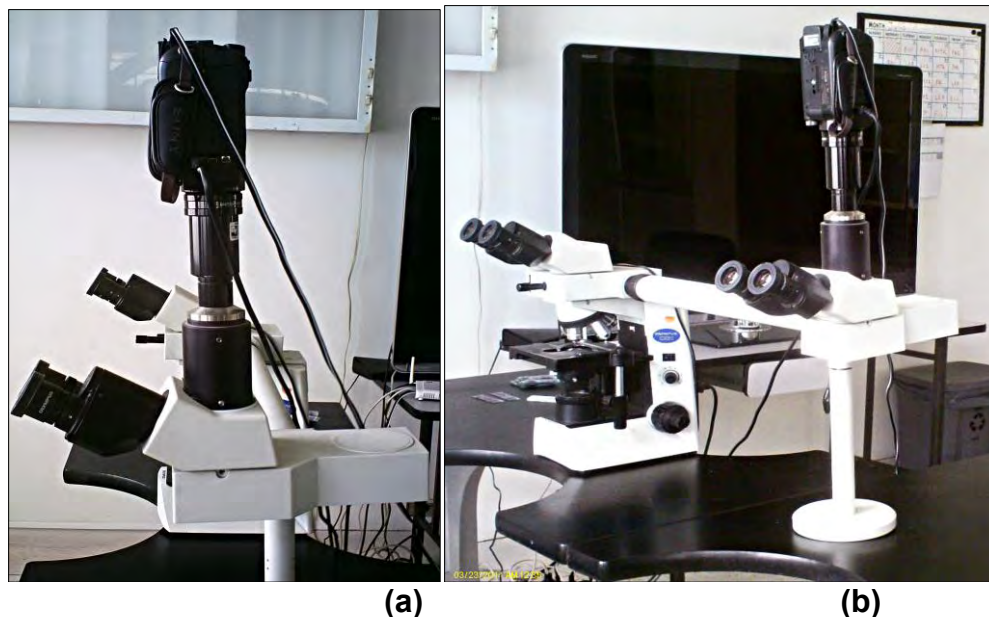
6.2 DIGITALIZACIÓN DE LAS PLACAS HISTOLÓGICAS

6.2.1 Adquisición de videos. El proceso de adquisición de imágenes se realizó con las placas histológicas de biopsias de seis pacientes mujeres con cáncer de mama, cinco con cáncer estromal gastrointestinal (GIS) y cuatro con Leiomiomasarcoma, según base de datos suministrada por la unidad de patología del

Hospital Universitario del Valle Evaristo García, para un total de quince placas histológicas analizadas por el patólogo. La cantidad de placas fue determinada por el patólogo jefe del banco de sangre, ya que era la base de datos que poseía las características adecuadas para realizar los análisis de mitosis de cáncer en estas específicas patologías, además de que contaban con los consentimientos informados de los pacientes, por pertenecer al registro nacional de cáncer.

Para este procedimiento se contó con una cámara Sony HD de 12 MPx HDR RX500, la cual captura fotografías de 1920x1080. Se realizó el procedimiento con el montaje a un microscopio de luz que se muestra a continuación. Además posee un acoplamiento en la parte de los lentes de objetivo suministrado por la Martin Microscope Company Adapter S/N: 5311, que permite proyectar la imagen que se ven este en un televisor plasma.

Figura 10. Montaje para la toma de muestras: (a) Microscopio de luz y acople de lente óptico a filmadora Sony RX500. (b) Sala de microscopia con conexión a otro microscopio y a televisor plasma HD



La captura de todos los videos se realizó a 40X de aumento y dependiendo del tipo de cáncer en 10 campos o más. Se observaron las zonas donde existía proliferación de mitosis y en cada campo el patólogo detectaba y contaba las mitosis.

Cuadro 11. Especificaciones de la captura de los videos de análisis histológico de GIS, Cáncer de mama y Leiomiomasarcoma. Todos realizados a 40X del microscopio y con resolución de una cámara Sony HDR RX500 de 12 MPx

VIDEOS	CÁNCER			CAMPOS ANALIZADOS	DURACIÓN DE VALORACIÓN (min)
	GIS	MAMA	LEIOMIOSARCOMA		
mama1.MTS		X		45	7 min
mama2.MTS		X		30	7 min 10 s
mama3.MTS		X		22	5 min
mama4.MTS		X		25	4 min 38 s
mama5.MTS		X		40	8 min 6 s
mama6.MTS		X		20	6 min 33 s
GIS1.MTS	X			35	8 min 40 s
GIS2.MTS	X			28	9 min 35 s
GIS3.MTS	X			42	8 min 13 s
GIS4.MTS	X			60	7 min 7 s
GIS5.MTS	X			4	1 min 31 s
Leio1.MTS			X	10	3 min 9 s
Leio2.MTS			X	18	8 min 20 s
Leio3.MTS			X	23	4 min 57 s
Leio4.MTS			X	27	5 min 47 s
TOTAL	5	6	4	276	95 min 8 s

Se establecieron características específicas que conformaron el procedimiento establecido para la adquisición de los videos de las muestras histológicas, controlando algunos factores de acuerdo a las necesidades identificadas para el procesamiento como los lugares de análisis dentro del enfoque de la placa donde existían mitosis o la cantidad de campos a analizar por el médico patólogo y con factores que no fueron controlados como el tipo de cámara con la que cuentan en el departamento de patología para realizar la captura de los videos o suciedades y objetos que estuvieran en la placa histológica y que afectaban la muestra. A continuación se presentan completamente los factores que se pudieron y los que no se pueden controlar en la captura del video.

Cuadro 12. Factores controlados y no controlados del protocolo de adquisición de Videos

La captura fue realizada con una cámara de video Sony HDR RX500.	Factor no controlado
Se utilizó acople del microscopio a la cámara, para la grabación de un objetivo estático.	Factor no controlado
Durante la captura el médico patólogo decidía la cantidad de campos que quería analizar, de forma subjetiva a lo sugerido por el equipo de los casos a analizar.	Factor controlado
Distancia de 37 mm del filtro de vidrio usado por el adaptador del microscopio y la videocámara.	Factor no controlado
Se tomaron como objeto de análisis para el procesamiento puntos en la placa donde existían mitosis.	Factor controlado
En las muestras de cáncer de mama, el médico patólogo, utilizó una flecha apuntadora para indicar los puntos donde existían mitosis.	Factor no controlado
Tinción que se utilizan en las todas las muestras (Hematoxilina-eosina).	Factor no controlado
Selección de la cantidad de imágenes necesarias para el procesamiento.	Factor controlado

Una vez se determinaron estos factores se propusieron las siguientes pautas en los que no son controlados, para mitigar el error en los nuevos procedimientos a desarrollar con la herramienta a implementar:

Cuadro 13. Decisiones tomadas sobre los factores no controlados

FACTOR	DECISIÓN
La captura fue realizada con una cámara de video Sony HDR RX500.	Las fotografías obtenidas eran HD de 12 MPx y las fotos obtenidas eran de 1920 x 1080 por lo tanto la cámara se conservó, ya que la resolución era bastante alta.
Se utilizó acople del microscopio a la cámara, para la grabación de un objetivo estático.	Las imágenes son estáticas y se analizan por campo, por lo tanto el acople se conservó.
Durante la captura el médico patólogo decidía la cantidad de campos que quería analizar, de forma subjetiva a lo sugerido por el equipo de los casos a analizar.	Se pasaron a fotogramas el video para tener el control de seleccionar las imágenes a analizar.
Distancia de 37 mm del filtro de vidrio usado por el adaptador del microscopio y la videocámara.	No supone un error significativo, por lo tanto se conservó.
En las muestras de cáncer de MAMA, el médico patólogo, utilizó una flecha apuntadora para indicar los puntos donde existían mitosis.	Se eliminó la flecha a través de procesamiento digital de imágenes.
Tinción que se utilizan en las todas las muestras (Hematoxilina-eosina).	Este brinda una imagen de una gama de tonos púrpura, por lo tanto se trabajaron las imágenes a blanco y negro y posteriormente se realizó la umbralización, para utilizar únicamente las formas de la placa relevantes para el conteo.

Para el análisis de las muestras de interés se observó que el médico patólogo duraba mucho tiempo en una sola toma del video, es decir en un solo campo de muestra, razón por la cual se decidió realizar el procesamiento digital a través de imágenes, motivo por el cual se extrajo un fotograma, con velocidad de una foto por segundo para cada uno de los videos. En este proceso se obtuvieron imágenes que no aportaban gran cantidad de información para los siguientes análisis a realizar como se observará más adelante en el cuadro 15, donde se especifican el total y de fotos por video y las imágenes elegidas. Por tanto fue necesario establecer parámetros para eliminar las que estuviesen repetidas, fuesen nulas o que hubiesen sido no válidas. Los factores de inclusión y exclusión para tomar la muestra de imágenes fueron los siguientes:

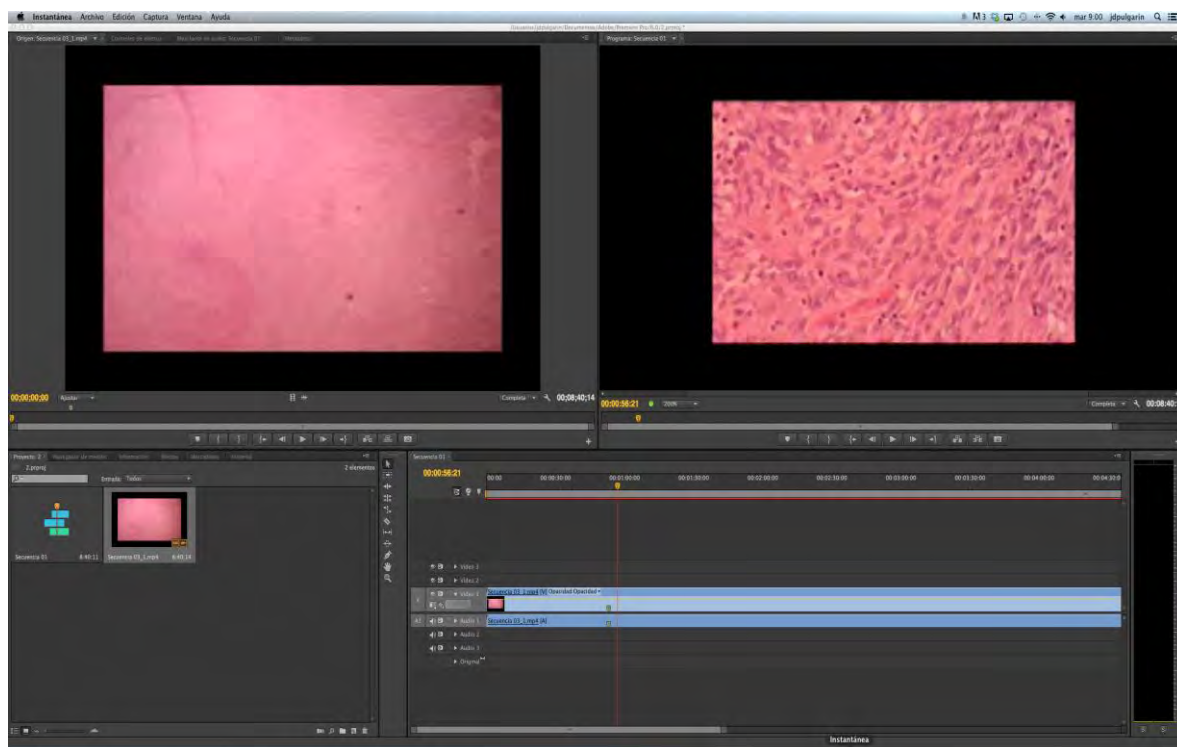
Cuadro 14. Factores incluyentes y excluyentes para el fotograma a generar a partir del video, para la selección de la muestra de imágenes a realizar procesamiento

La imagen presenta un zoom diferente a 40X en el campo que el patólogo está analizando con el microscopio.	Parámetro de exclusión
<i>Imagen no válida:</i> Las imágenes del fotograma del video que no presentan una nitidez debido a la alta borrosidad en la imagen.	Parámetro de exclusión
Una misma imagen se <i>repite</i> más 1 vez en el fotograma.	Parámetro de exclusión
Imágenes donde se observa alta proliferación de mitosis.	Parámetro de inclusión
Imágenes donde se observan objetos no relacionados, como suciedades u objetos muy grandes que puedan afectar el procesamiento en general de las imágenes.	Parámetros de exclusión
Imágenes en un solo tono y uniformes, que no presenten ningún registro celular.	Parámetros de exclusión

6.2.2 Adquisición de Imágenes a través de fotogramas. A través del programa Adobe Premiere Pro CS6, se convirtió este video a un fotograma, para posteriormente pasar a eliminar foto por foto según parámetros de inclusión y exclusión determinados.

Lo primero que se realizó en este programa fue importar el video a procesar. Posteriormente se activa la secuencia que se desea exportar a fotograma y se debe colocar en la barra del área de trabajo, que se encuentra en la sección de la secuencia visible en el panel de la línea de tiempo, como se muestra a continuación.

Figura 11. Importación del video de cáncer de mama con el Adobe Pro Premiere CS6 para MAC. Tercer cuadro, línea de tiempo del video



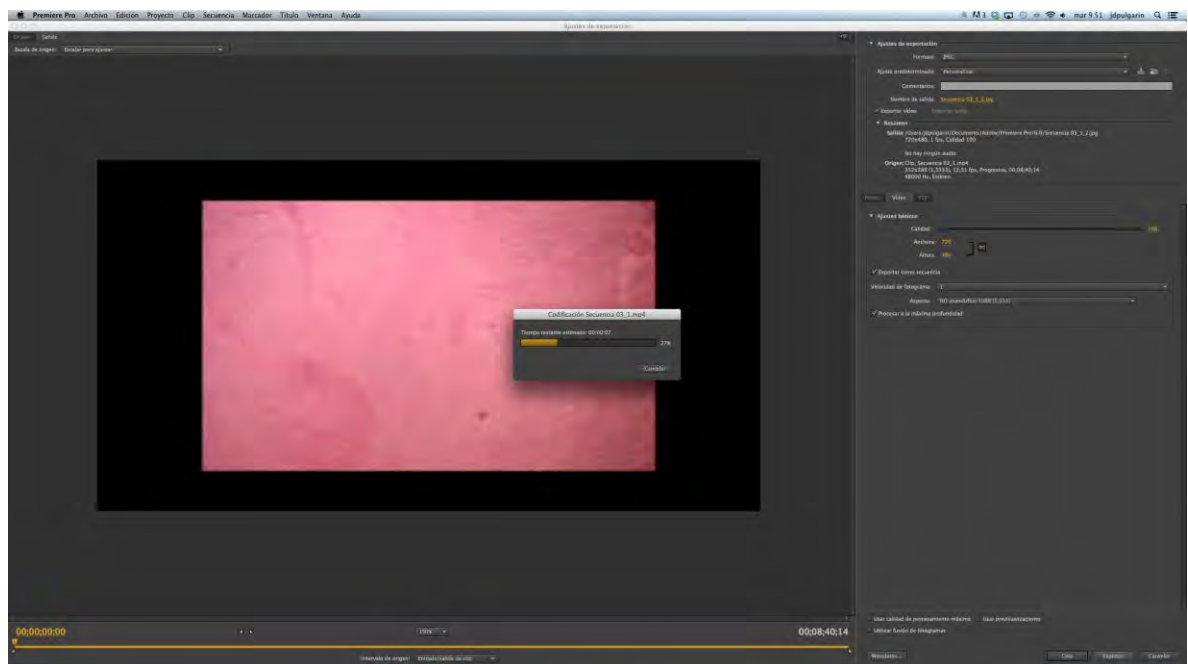
Una vez que se obtuvo el video en la secuencia de procesamiento, se seleccionó en la barra de herramientas la opción Archivo, exportar medios, de donde se desplegaron las opciones para convertir a fotograma el video. Los ajustes de exportación para las imágenes fueron las siguientes:

Cuadro 15. Ajustes de exportación de fotograma en Adobe Pro Premiere CS6 para Mac

FORMATO	JPEG
AJUSTE PRDETERMINADO	Secuencia NTSC DV de Pantalla de 24p
CALIDAD	100
VELOCIDAD DE FOTOGRAMA	1
ASPECTO	D1/ DV NTSC Pantalla ancha 16:9 (1,2121)
SELECCIÓN DE PROCESAMIENTO DE MÁXIMA PROFUNDIDAD	
SELECCIÓN DE EXPORTACION DE VIDEO	

Las imágenes serán almacenadas en la ruta predeterminada para los procesamiento del Adobe. Para esta obtención de fotogramas de video, puede ser usado cualquier tipo de procesador de video que permita realizar la segmentación y obtención de imágenes. En este caso se decidió usar el adobe, ya que poseía herramientas de alta calidad de procesamiento y al ser ejecutado en un computador Mac, proveía mayor rapidez para la conversión de video.

Figura 12. Selección de características, ajustes de exportación y procesamiento



Una vez se procesaron los videos y se almacenaron las imágenes, se obtuvieron los siguientes resultados:

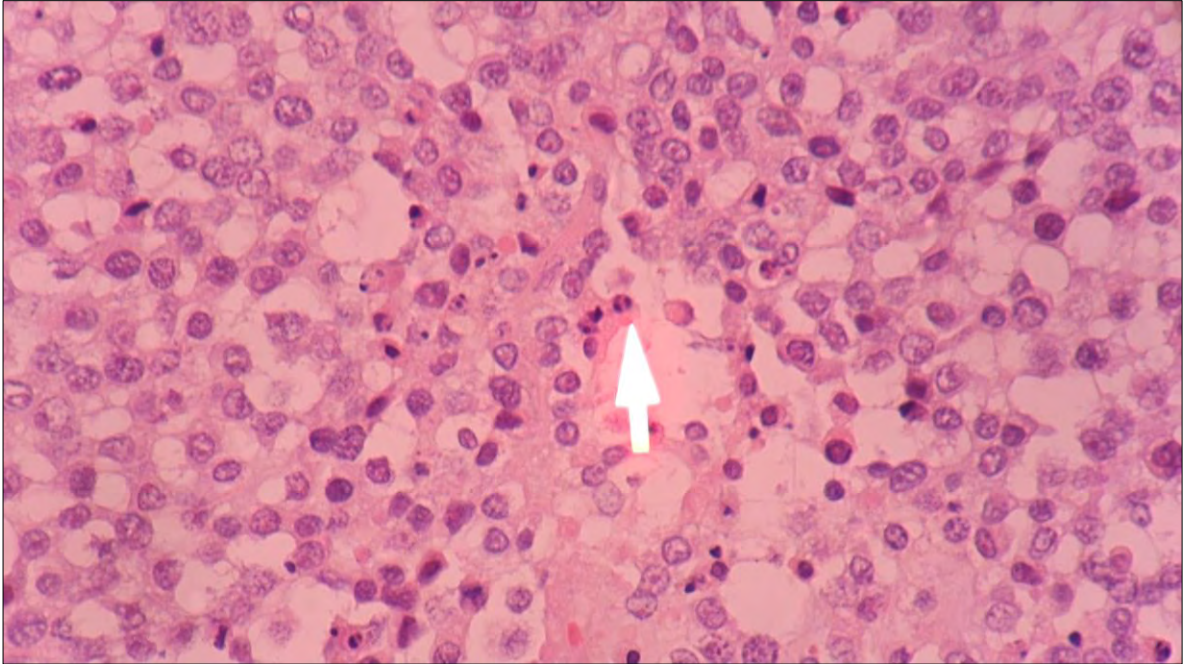
Cuadro 16. Especificaciones del fotograma para análisis histológico de GIS, Cáncer de MAMA y Leiomiomasarcoma. Procesados con el Adobe Premiere Pro CS6

VIDEOS	CÁNCER			CANTIDAD DE IMÁGENES TOTALES OBTENIDAS	CANTIDAD DE IMÁGENES SELECCIONADAS
	GIS	MAMA	LEIOMIO SARCOMA		
mama1.MTS		X		420	59
mama2.MTS		X		430	35
mama3.MTS		X		300	12
mama4.MTS		X		278	45
mama5.MTS		X		486	51
mama6.MTS		X		393	31
TOTAL MAMA				2307	233
GIS1.MTS	X			520	55
GIS2.MTS	X			575	25
GIS3.MTS	X			493	30
GIS4.MTS	X			427	15
GIS5.MTS	X			91	34
TOTAL G.I.S				2106	159
Leio1.MTS			X	189	17
Leio2.MTS			X	500	45
Leio3.MTS			X	297	26
Leio4.MTS			X	347	4
TOTAL LEIOMIOSARCOMA				1333	92
TOTAL	5	6	4	5746	484

En la anterior tabla se registraron todas las fotos obtenidas después del procesamiento con el Adobe Premiere Pro CS6. Del cáncer de mama fue del que más imágenes se obtuvieron con un total de 2307 fotos, posteriormente 2106 fotos obtenidas de Tumor estromal Gastrointestinal y 1333 de Leiomiomasarcoma. Las cuales constituirán una base de datos suficiente para probar el funcionamiento del software y que logre ser validado por el análisis del patólogo.

Según el material registrado por los videos, se obtuvieron como se ve en las siguientes tres figuras, las imágenes más representativas de los tres tipos de cáncer a tratar en este proyecto, puesto que son las zonas donde más mitosis se observan y son detectadas por el médico patólogo.

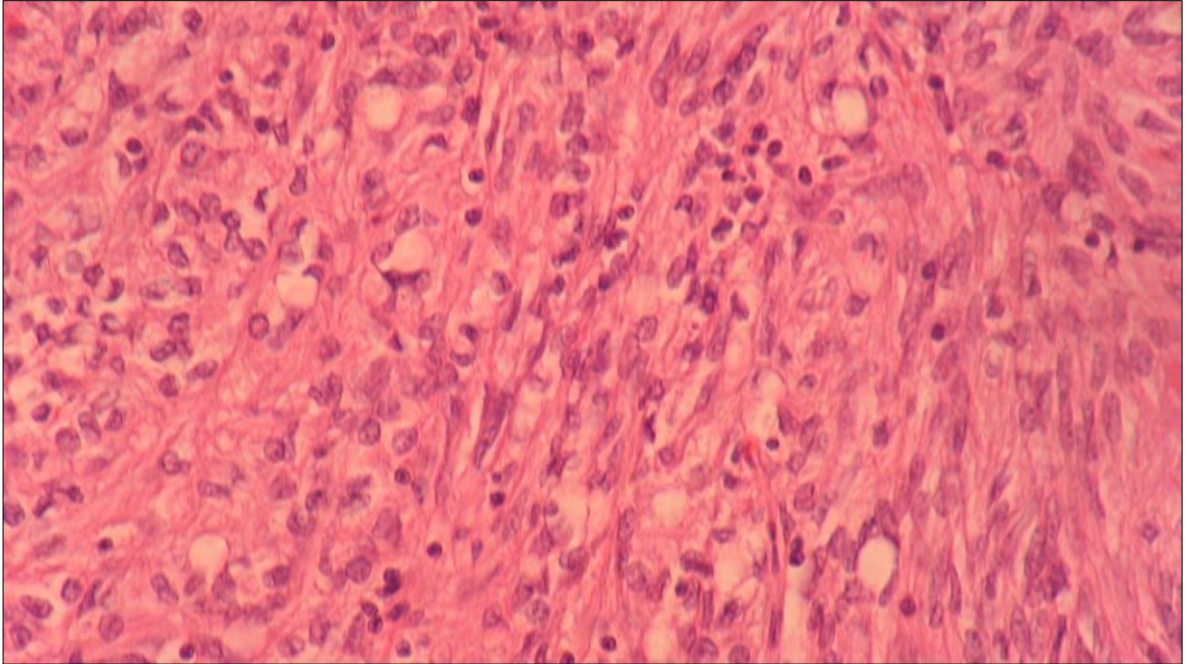
Figura 13. Placa histológica de cáncer de mama



Esta imagen fue una de las capturadas por el procesamiento del video, donde justamente el patólogo está señalando con el indicador amarillo, que en ese lugar se encuentra una mitosis. Esta fotografía evidencia la técnica usada en la unidad de patología en la cual se hace un conteo manual, ayudado únicamente por herramientas indicativas sobre la placa histológica.

El tejido de la mama se observa con células definidas, redondas o con formas ovaladas definidas, de núcleos muy densos, y con muy poco registro de linfocitos. Poseen células en apoptosis en este campo capturado por el procesamiento y contenidos celulares muy acidofílicos.

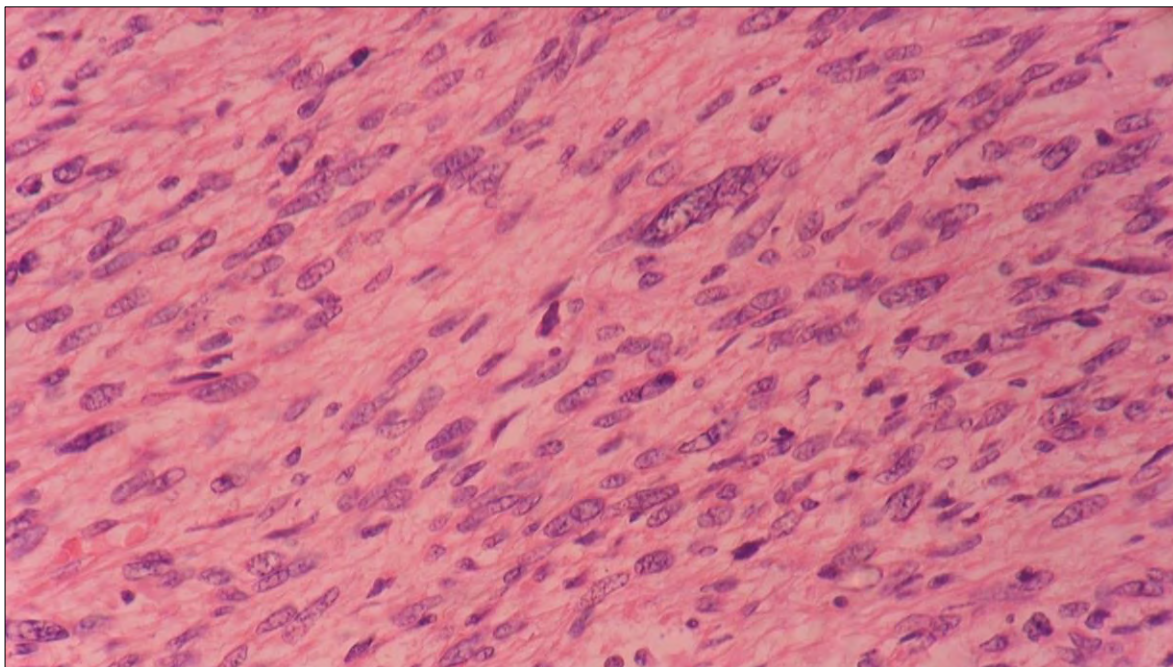
Figura 14. Placa histológica de Cáncer por Tumor Estromal Gastrointestinal (G.I.S)



En la anterior imagen se puede observar un cáncer de Tumor estromal gastrointestinal, el cual se compone de células alargadas y otras redondas, algunos linfocitos y mucho material acidofílico. Las células como se pueden apreciar, no presentan un patrón. Unas son alargadas y otras redondas, esto gracias a que este tumor se deriva de tejido conectivo. Muchas células están altamente densas por lo cual se debe analizar muy bien cuáles son los puntos en los cuales pueden haber verdaderas mitosis en esta placa.

De la base de datos obtenida, esta fotografía es una de las más significativas, puesto que muestra el tejido que compone el aparato intestinal estromal, el cual presenta áreas lisas, razón por la cual las células se tornan alargadas, por lo cual exhiben morfologías diferentes a las células del tejido de mama anteriormente comentado. *“La conservación de la membrana intacta es más difícil de apreciar en estas células, ya que por su tipología extendida pueden ser confundidas con otro tipo de organelos que no sean parte del núcleo”*. Lo anterior afirmado por el patólogo Josué Asprilla del H.U.V. mientras eran obtenidas las muestras de los videos de las placas.

Figura 15. Placa Histológica de Leiomiiosarcoma



Los videos de cada placa histológica fueron almacenados en un computador, procesados en el Adobe Premiere Pro CS6 de lo cual se extrajo una librería de fotos por cada placa a procesar. Se seleccionó para realizar el fotograma la opción de obtener 1 foto por segundo.

Las librerías fueron analizadas foto por foto, para posteriormente ser eliminadas o aceptadas según los parámetros de la tabla 4. Los archivos de las carpetas fueron almacenados en .JPEG y los videos en .MTS

A continuación se presentan las características las imágenes obtenidas:

Cuadro 17. Características de las imágenes

Altura	1080 Píxeles
Ancho	1920 Píxeles
Profundidad de bits	24
Tipo de elemento imagen	JPG
Interpretación fotométrica	RGB

6.3 DISEÑO DE LA HERRAMIENTA SISTEMÁTICA

6.3.1 Obtención de patrones morfológicos para selección de mitosis en placa histológica. Para diseñar el software fue necesario establecer los siguientes parámetros biológicos, que permitirían a través de características morfológicas y patrones repetitivos, lograr contar la cantidad de mitosis de forma automática en la placa histológica. Se presentan a continuación los patrones determinados con el patólogo Josué Asprilla del H.U.V y el atlas de Histología con correlaciones clínicas de Dongmei Cui y revisando la base de datos de las placas obtenidas para este estudio. Determinar aspectos morfológicos y biológicos que le permitan detectar a la herramienta si es una mitosis o no:

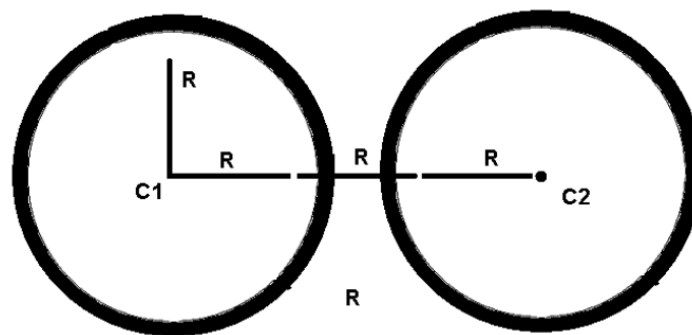
Cuadro 18. Patrones de determinación de verdaderas y falsas mitosis al microscopio por tinción de H&E

Patrón de verdadera mitosis al microscopio con tinción de H&E	Patrón de falsa mitosis al microscopio con tinción H&E	Similitudes entre los dos patrones
<p>Los núcleos Presentan un color púrpura condensado, ya que son elementos basofílicos y sus propiedades son ácidas.</p> <p>Las mitosis se presentan como manchas alargadas y oscuras.</p> <p>Las fases más sencillas de detectar es la forma de once (11) de una mitosis, que ocurre cuando se encuentra en la anafase y la telofase, las cuales son muy fáciles de apreciar a simple vista.</p> <p>Existen las mitosis tripolares, las cuales aparecen en tripletas y son signo de malignidad.</p> <p>Los radios impares en la anafase y telofase son signos de malignidad del tumor.</p>	<p>Células que presenten Necrosis:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estas son células alargadas de apariencia hinchada. - Son muy densas al igual que en una mitosis normal. - Su material celular condensado está aleatorio y sus fragmentos nucleares disueltos. - El tejido está inflamado. - La membrana está rota. <p>Células que presenten Apoptosis:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estas son células pequeñas y contraídas. - Poseen cuerpos apoptóticos. - El núcleo de estas ordenado. - Poseen mucha condensación y pigmentación por preferencia basofílica. - La membrana está conservada completamente. <p>Linfocitos: Casi alcanzan la simetría y su apariencia es muy condensada (Fuerte tono púrpura).</p>	<p>Alta condensación (color púrpura oscuro) en materiales celulares que presentan basofilia, como el núcleo en el caso de las mitosis reales y en material apoptótico, necrótico y linfocitos en la falsa mitosis.</p> <p>Los linfocitos, las células en apoptosis y las células en mitosis verdadera, presentan membrana conservada y un núcleo ordenado.</p>

Las similitudes presentadas entre las verdaderas y falsas mitosis que se pueden llegar a detectar, van a permitir tomar decisiones para el procesamiento que debe realizar el software, ya que por estas se pueden presentar errores de identificación por parte del software en las mitosis. Adicional a esto se usará una hipótesis planteada por Martín Pustilnik de la Universidad de Buenos Aires, en su *“Análisis del crecimiento poblacional de cultivos celulares a tiempos prolongados, monitoreados sobre un microscopio, de forma autónoma”*²⁸. Esta enuncia la siguiente hipótesis para células que se encuentren solapadas (unas sobre otras) y no cumplan con una distancia la siguiente distancia de separación:

- “Si es detectada una célula con un centro C1 y radio R, la célula más cercana dentro de C2 estará al menos a una distancia de $3 \cdot R$ de C1”:

Figura 16. Distancia mínima entre dos células



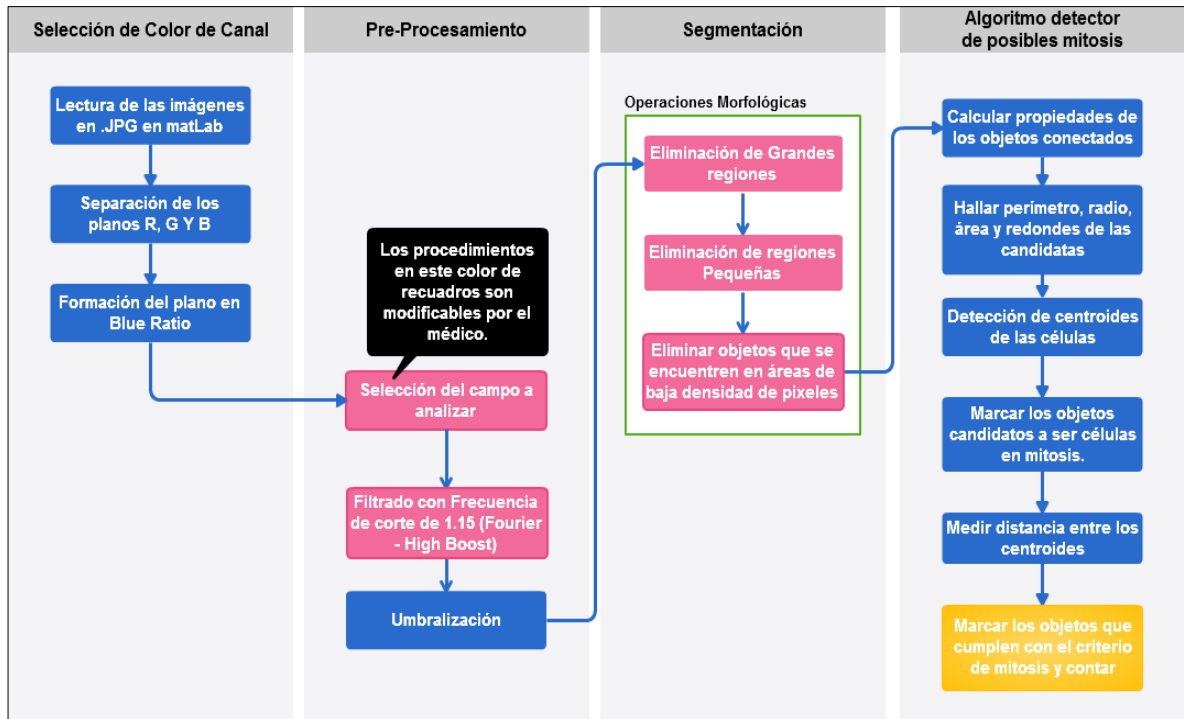
Fuente: Imagen obtenida de Universidad de Buenos Aires. Martín Pustilnik. L.U

Con base en los dos patrones detectados y en la hipótesis adicional de Pustilnik se tomaron varias determinaciones para llevar a cabo el desarrollo de la herramienta. La primera es que no se podrá realizar un análisis de color para el procesamiento de imágenes con tinción de H&E, puesto que es un patrón que tienen en común las verdaderas y falsas mitosis, por tanto se debe trabajar la imagen por análisis morfológico. La segunda consideración es que serán detectadas las células en anafase y telofase, ya que estas presentan un patrón de distancia mínimo establecido para ser detectado.

²⁸ PUSTILNIK M. Análisis de del crecimiento poblacional de cultivos celulares a tiempos prolongados, monitoreados sobre un microscopio de forma autónoma. Proyecto de Pregrado en Computación. Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2011, 65 p.

El diseño del software se realizó siguiendo los patrones determinados anteriormente. En el siguiente diagrama de flujo se plantea el procedimiento que debe realizar el software para llegar al conteo de las células.

Figura 17. Diagrama de flujo de la herramienta de procesamiento de imágenes histológicas



6.3.2 Selección del canal de color.

6.3.2.1 Planos RGB. Haciendo uso de la herramienta MatLab, se realizó una exploración de espacios de color, por tanto la imagen a procesar por el programa, se dividió en los **planos RGB**. Se realizó una comparación visual entre las tres capas, para saber cuál era la más adecuada y seguir realizando el pre procesamiento.

6.3.2.2 Formación en Blue Ratio. Por el parecido en las frecuencias de color y el poco aporte que éste representaba en las imágenes, se optó por generar una nueva que sería en **Blue Ratio** (BR). Esta imagen transformará el RGB en BR para acentuar el tinte nuclear, decisión que soporta una investigación realizada por

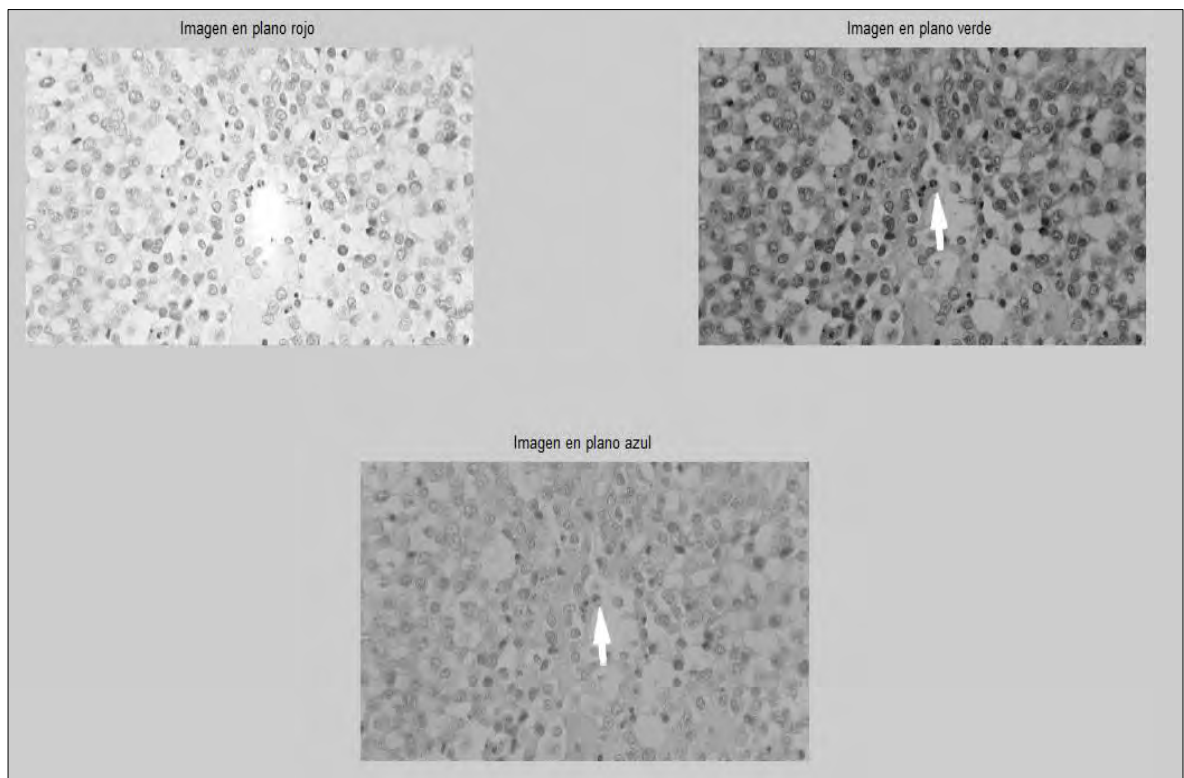
la Universidad de Joseph Fourier de Grenoble, Francia²⁹, desarrollada por el departamento de Matemática y ciencias de la información.

La fórmula del blue ratio aplicada para generar la imagen fue:

$$BR = \frac{100 \times B}{1 + R + G} \times \frac{256}{1 + B + R + G} \quad \text{Ecuación 1}$$

A continuación se presenta la imagen dividida en planos R, G y B, capas que son extraídas de la figura de cáncer de mama mostrada anteriormente, se observa que los colores y frecuencias son bastante parecidas, por tanto se genera BR:

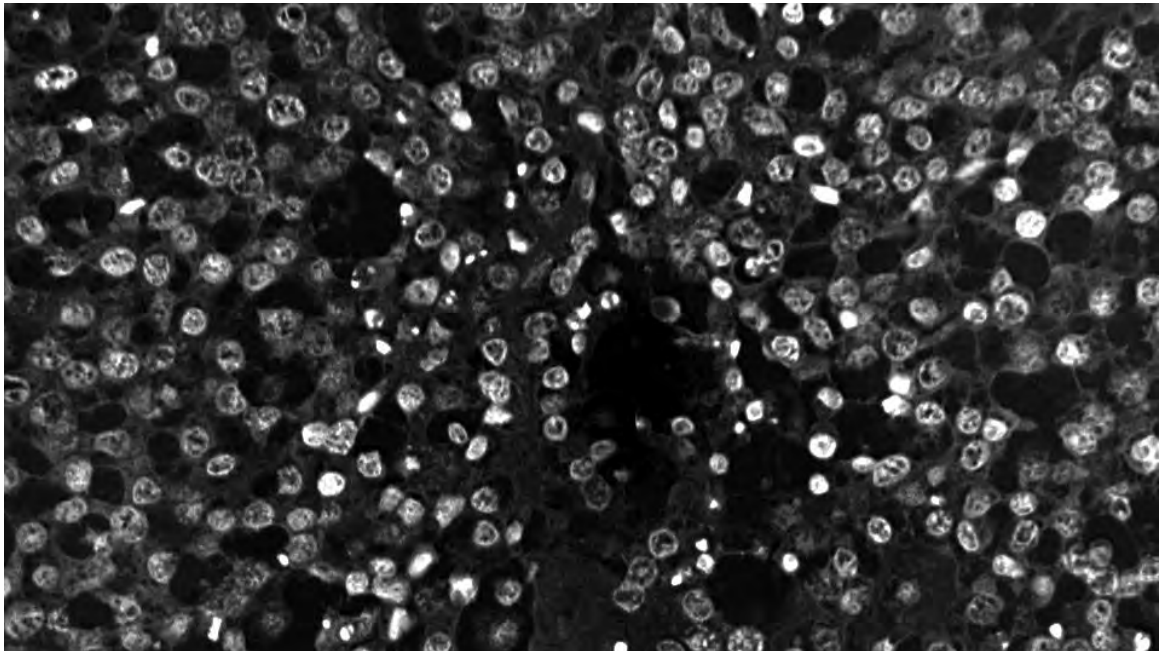
Figura 18. Planos RGB de la imagen de entrada de cáncer de mama



²⁹ IRSHAD, H., Op Cit. p 5.

Se observa que el plano Rojo es el más claro en la imagen y los tonos rosas los convierte en una escala de grises que la hacen un panorama de fondo uniforme. Por otra parte el plano verde resalta los tonos más oscuros y alcanza a retener casi toda la información de la imagen original pero convertida a grises. Mientras que el plano azul no posee tanto contraste y se torna en una imagen menos útil.

Figura 19. Imagen Blue Ratio



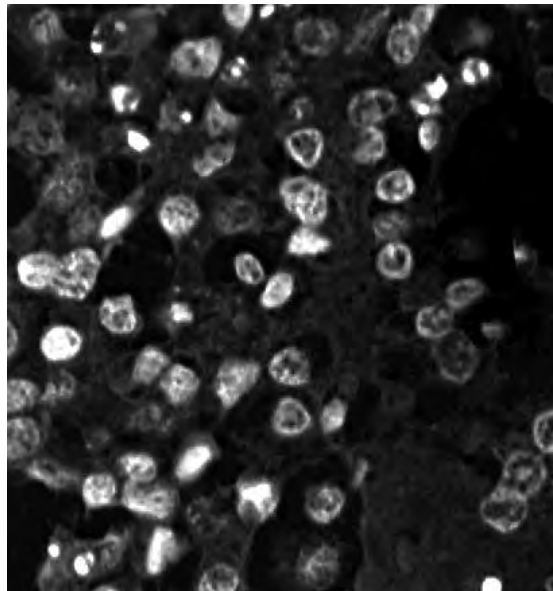
Este método de BR invierte la imagen y resalta las formas con alto contraste; almacena alta información de las figuras originales y además permite que la umbralización sea mucho más sencilla de realizar puesto que ya con este procesamiento han quedado en alto contraste las imágenes de interés, los cuales corresponden a las células y sus núcleos y en bajo contraste el resto de material celular y componentes de tejido.

6.3.3 Pre procesamiento

6.3.3.1 Selección del campo a analizar. Al ejecutar el programa y tener la imagen en BR, el médico podrá seleccionar el campo a analizar de la placa. Esto se hizo con el fin de facilitar el estudio de las zonas de interés y mitigar los falsos positivos, puesto que se despreciará bastante información de la placa al

segmentar la zona real de interés del patólogo. El segmento seleccionado será la pieza a procesar y el campo donde serán detectadas las mitosis.

Figura 20. Segmento de la imagen seleccionada en formato BR

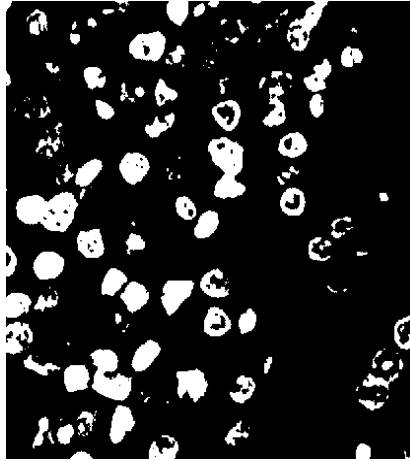


6.3.3.2 Filtro High Boost en Fourier. Este filtro se desarrolló en el dominio de la frecuencia, por lo tanto se estableció una frecuencia de corte de 1,15 Hz, se estableció probando frecuencias de corte diferente. Las frecuencias superiores a 5 hacían a la imagen opaca hasta llegar a lo muy oscuro; Y las frecuencias menores a 1 dejaban la imagen casi igual a la original en BR. El filtro fue implementado ya que la imagen en BR se veía borrosa y necesitaban resaltarse las frecuencias altas de la imagen. En la imagen anterior ya tiene aplicado el filtro High Boost.

6.3.3.3 Umbralización. Este procedimiento se hizo con tal de dejar solamente los núcleos de las células y descartar el resto de material celular, puesto que son los que más alta frecuencia tienen. Las formas que quedan son las de las células y ya no se tienen fondos en tonos de gris, que no aportan información relevante para el proceso de mitosis a analizar. Hay elementos que quedan y que no son núcleos, pero que deberán ser posteriormente descartados.

Como se puede observar en la imagen a continuación, los niveles de color que quedan en la umbralización son solo dos: el negro (0) y el blanco (255).

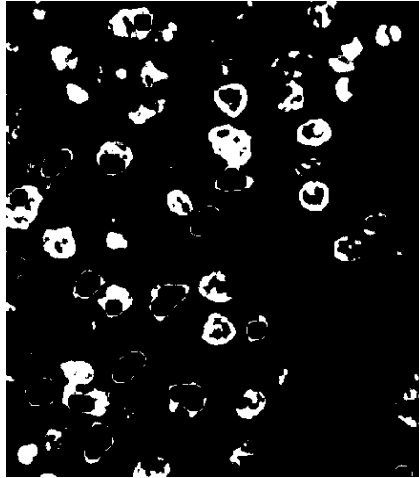
Figura 21. Segmento de la imagen umbralizada



6.3.4 Segmentación. Con el fin de obtener las regiones de interés de las placas histológicas digitalizadas, se seleccionó la técnica de segmentación mediante filtrado morfológico en donde se utilizaron operaciones como apertura, dilatación y cierre de los objetos detectados en la imagen mediante la umbralización. A continuación, se explican en detalle las operaciones realizadas.

6.3.4.1 Eliminación de las regiones grandes. En esta imagen se eliminaron los objetos con geometría circular cuyo radio que fuesen mayores a 10 píxeles, ya que se consideran material celular que no fue bien filtrado y que no representan un aporte al análisis de la imagen. Este parámetro será variable, para que el médico lo manipule según el interés de la célula a analizar, puesto que las morfologías cambian.

Figura 22. Resta de regiones grandes



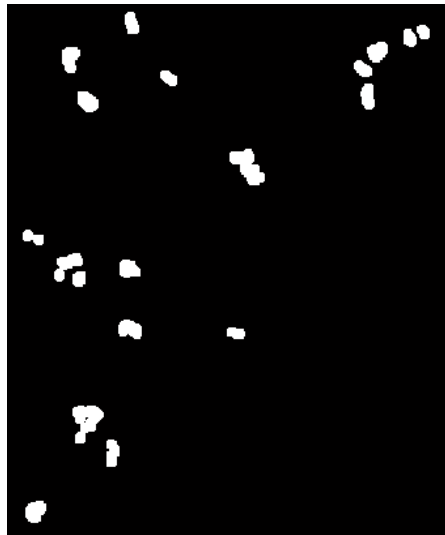
6.3.4.2 Eliminación de regiones muy pequeñas. En la siguiente imagen se eliminaron los objetos cuyo radio fue menor a 6 píxeles, las cuales constituyen material celular muy mínimo, u organelos que no desaparecieron con la umbralización. Este parámetro también será variable por el médico.

Figura 23. Imagen de segmentos sin las regiones pequeñas a 6 Píxeles de Radio



6.3.4.3 Eliminación de objetos presentes en área de baja densidad de píxeles. Se aplicó la operación morfológica *bwopenarea* para contenidos extracelulares que poseen una cantidad de píxeles que no tuviesen relevancia, con el fin de lograr una imagen lógica más limpia para la detección de verdaderos positivos en mitosis. Este parámetro será variable por el médico. En la figura 22, se muestra una imagen en el cual el parámetro de eliminación por área es de 200 píxeles.

Figura 24. Imagen con segmentos que son mayores a 200 Píxeles



6.3.5 Algoritmo detector de posibles mitosis. Con el fin de detectar el menor número posible de falsos positivos en las placas histológicas se extrajeron características fenotípicas de núcleos en mitosis tales como: radio, área, perímetro, redondez y distancia entre núcleos (esta específicamente para etapas de anafase y telofase de una célula en división celular). Para esto se tomó una población de 50 células en mitosis, de las cuales se extrajo una muestra de 31 casos, en las cuales se aplicaron herramientas estadísticas como: media, varianza, máximos, mínimos y desviación estándar para determinar si se trata de una mitosis.

6.3.5.1 Detección de centroides de las células. Para poder determinar la distancia entre núcleos y los radios de los mismos, fue necesario detectar primero los centroides de cada uno de estos, tal como se muestra en la figura 25.

Figura 25. Detección de centroides de las candidatas a mitosis



6.3.5.2 Extracción de las características fenotípicas de las candidatas.

Debido a que los objetos son pequeños, fue posible utilizar la función de Matlab ***regionprops*** en donde fue posible extraer las características de área, perímetro y redondez. En cuanto al radio de las candidatas, fue necesario utilizar el diámetro de las posibles mitosis y calcularlo por medio de este.

Después de extraídas las características fenotípicas se obtuvieron los siguientes resultados en cuanto a la muestra de 31 campos tomada para caracterizar un patrón que pudiese determinar si hay mitosis o no.

Cuadro 19. Características fenotípicas obtenidas de una muestra de 31 campos en los diferentes tipos de cáncer trabajados. (a) Radio, (b) Área, (c) Perímetro, (d) Redondez

RADIO	
MEDIA	13,85172414
VARIANZA	6,486164778
DESVIACION ESTÁNDAR	2,546795001
COEF DE VAR	0,183861227
MEDIANA	13,500000000
XMIN	9,200000000
XMAX	5,905500000
TOTAL	31

(a)

ÁREA	
MEDIA	620,32258065
VARIANZA	39491,22581
DESVIACION ESTÁNDAR	198,723994
COEF DE VAR	0,320355893
MEDIANA	627,000000000
XMIN	266,000000000
XMAX	1102,000000000
TOTAL	31

(b)

PERIMETRO	
MEDIA	114,24211000
VARIANZA	564,2637262
DESVIACION ESTÁNDAR	23,75423596
COEF DE VAR	0,207928897
MEDIANA	109,980000000
XMIN	75,112700000
XMAX	187,036600000
TOTAL	31

(c)

REDONDEZ	
MEDIA	0,63377406
VARIANZA	0,02904101
DESVIACION ESTÁNDAR	0,170414231
COEF DE VAR	0,268887986
MEDIANA	0,630000000
XMIN	0,38610000
XMAX	0,92780000
TOTAL	31

(d)

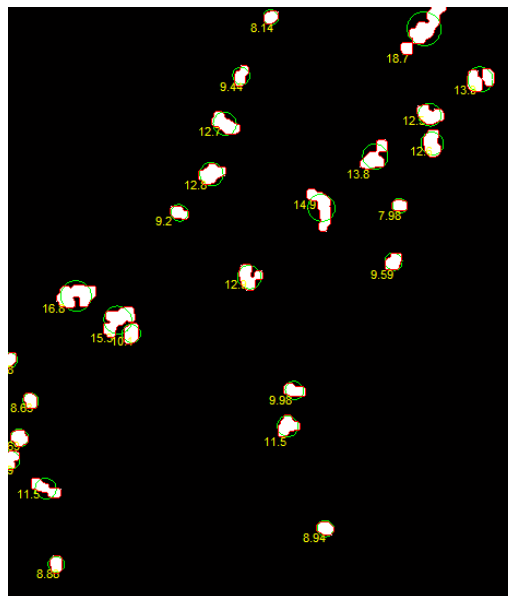
De las anteriores tablas se puede determinar que sí existe un patrón asociado en cuanto a características fenotípicas de una mitosis. Al observar los resultados de la caracterización se puede apreciar que las medidas no varían mucho los diferentes tejidos y campos analizados. Se puede afirmar entonces que en promedio una célula mitótica humana posee un radio de 13,8517 px. Un perímetro de 114,2421 px, área de 620,32 px y una redondez de 0.6433 px.

Posteriormente se implementó un algoritmo que descartaba los objetos que no estuviesen bajo los cuatro rangos definidos y caracterizados anteriormente, por tanto este operaba bajo una máxima y una mínima medida obtenida gracias a la suma y resta del promedio con el coeficiente de variación de la medida como se muestra a continuación.

Cuadro 20. Establecimiento de máximos y mínimos para desarrollo del algoritmo que detecta mitosis bajo parámetro fenotípicos

	Promedio	+	-
RADIO	13,8517	16,3985	11,305
PERIMETRO	114,2421	137,996	90,4879
REDONDES	0,643377	0,81379	0,47296
ÁREA	620,3235	819,047	421,600

Figura 26. Detección de radios de las candidatas a mitosis



6.3.5.3 Medir distancia entre los centroides. El cálculo de las distancias entre los centroides de las candidatas a mitosis fue posible mediante la ecuación de distancia euclidiana:

$$D(i) = \sqrt{((x(i) - x(i - 1)))^2 + ((y(i) - y(i - 1)))^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde i representa cada uno de los objetos detectados como candidatas a mitosis, x los datos de la primera columna de los centroides y y los datos de la segunda columna de los centroides.

Cuadro 21. Caracterización de la distancia entre las células en proceso de mitosis

Distancia en Px	
MEDIA	17,03965517
VARIANZA	6,099553448
DESVIACION ESTÁNDAR	2,469727404
COEF DE VAR	0,144939987
MEDIANA	17,02000000
XMIN	11,34000000
XMAX	21,71000000
TOTAL	31

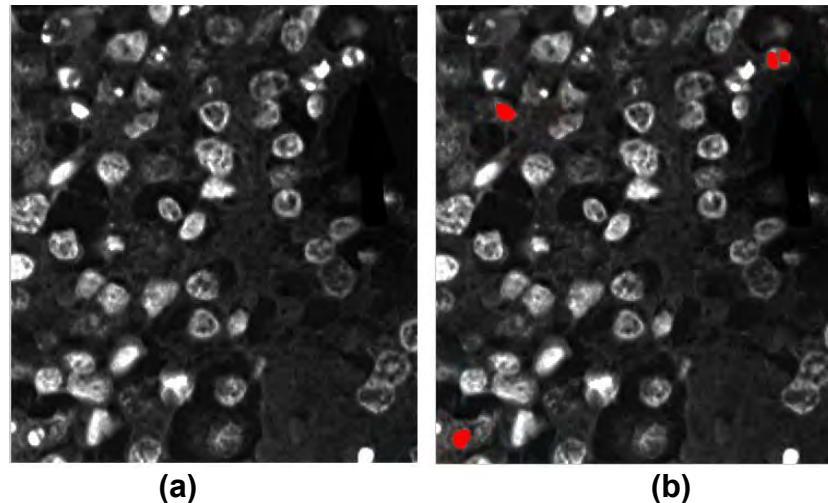
De la anterior tabla se afirma que existe una distancia para las mitosis que están en la etapa de anafase y telofase en la cual se logra observar una clara división del núcleo entre las células, donde se presentó un promedio de 17.03 px. Al igual que con las otras características fenotípicas anteriores, se obtuvo un máximo y mínimo valor para desarrollo del algoritmo en estas dos etapas.

Cuadro 22. Establecimiento de máximos y mínimos para desarrollo del algoritmo que detecta mitosis bajo parámetro fenotípicos en las etapas de anafase y telofase

	Promedio	+	-
DISTANCIA EN PÍXELES	17,3965	19,8662	14,9268

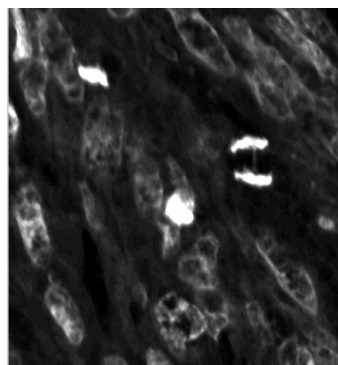
6.3.5.4 Marcar objetos que cumplen con el criterio de mitosis y contar. Se utilizaron 2 criterios para determinar si las candidatas son en realidad mitosis basados en la caracterización fenotípica nombrada anteriormente, el primer criterio está relacionado con la distancia entre núcleos para los cuales se utilizaron los valores de la tabla 19, en donde si la distancia entre las células estaba en ese rango sería contada como una mitosis. De lo contrario, se aplicará el otro criterio en el cual, se compararan los valores de radio, área, perímetro y redondez del objeto y si cumple con los rangos de valores establecidos en la tabla 17, será contabilizado como una mitosis.

Figura 27. Detección de mitosis en caso de cáncer de mama. (a) Imagen en Blue Ratio con ajuste de contraste. (b) Marcación de las candidatas a mitosis



Como se puede apreciar en la figura 27, de 3 mitosis verdaderas positivas, el software detectó 2 y una como falso positivo. Como se puede observar en las marcaciones, la mitosis que se encuentra en el extremo superior derecho fue detectada por criterio de distancia mientras que la mitosis que se encuentra en la parte inferior izquierda de la imagen b, fue detectada por parámetros de área, redondez, perímetro y radio.

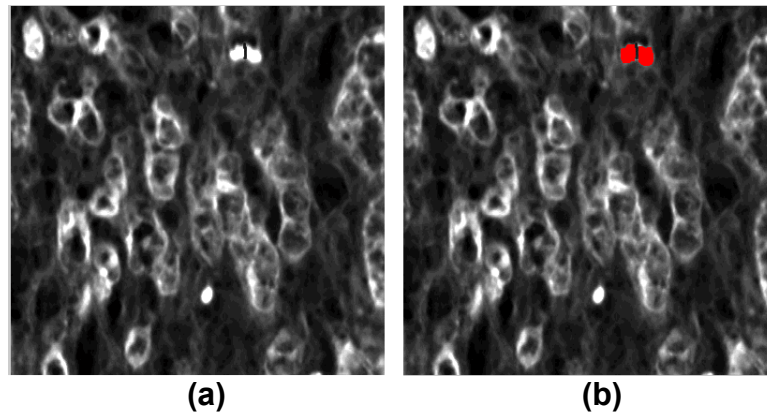
Figura 28. Caso de mitosis en tejido con Leiomiosarcoma



En la figura 28 solo hay una mitosis que se encuentra en telofase, debido a que la separación de las células hijas es mucho más grande que la caracterización de

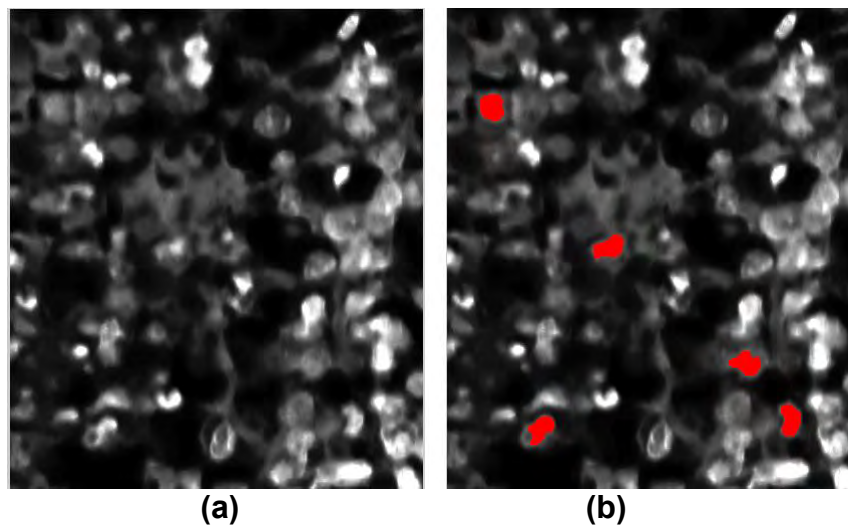
distancia en centroides que se hizo, el software es incapaz de detectarlo como una mitosis permitiendo tener un falso negativo.

Figura 29. Detección de mitosis en caso con Leiomiosarcoma. (a) Imagen en Blue Ratio con ajuste de contraste. (b) Marcación de las candidatas a mitosis



En la figura 29, la herramienta computacional logró detectar una mitosis en la etapa de anafase en la cual la distancia de separación entre células hijas está dentro del rango caracterizado.

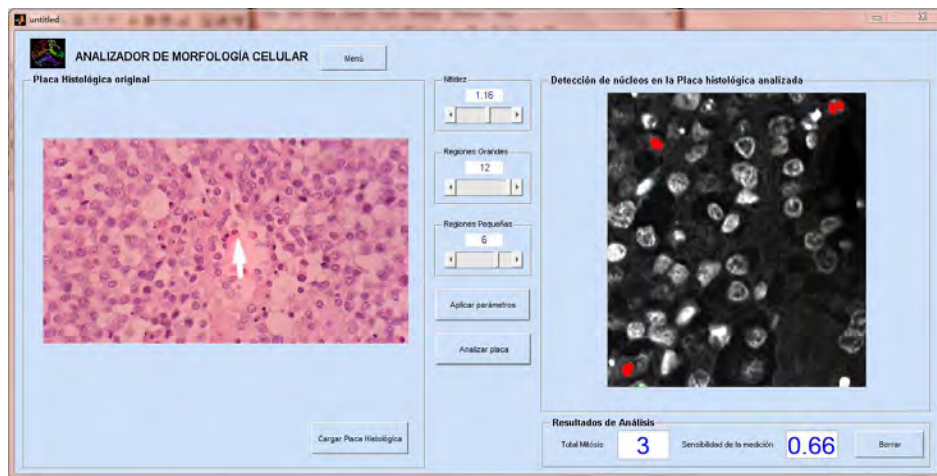
Figura 30. Detección de mitosis en caso con tumor estromal gastrointestinal (GIS). (a) Imagen en Blue Ratio con ajuste de contraste, (b) Marcación de las candidatas a mitosis



Por otro lado los casos de GIS, la herramienta computacional no funciona de la manera esperada, debido a que hay presencia abundante de cromatina condensada por lo tanto se presentan 5 falsos positivos y 1 falso negativo.

Finalmente se decidió implementar una interfaz en la cual el medico patólogo pueda cargar la placa histológica que desea analizar, en la cual puede variar parámetros como: Nitidez de la imagen, el tamaño de las regiones grandes y regiones pequeñas que desea eliminar que no son de interés. La herramienta computacional entrega al final del análisis la cantidad de mitosis detectadas y la sensibilidad que posee la herramienta según el tejido que se registró.

Figura 31. Interfaz de la herramienta computacional



7. RESULTADOS OBTENIDOS

Se diseñó una herramienta computacional para la detección y el conteo de mitosis en tres tipos de cánceres: mama, Leiomiosarcoma y GIS. Para darle validez a la herramienta, se analizó el comportamiento de la misma en 3 placas histológicas (30 imágenes, 10 por caso) y se asoció la cantidad de verdaderos positivos, falsos negativos, falsos positivos y la sensibilidad dados por la herramienta.

El porcentaje de sensibilidad de la herramienta fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN} \quad \text{Ecuación (3)}$$

En donde TP= Verdaderos positivos y FN= Falsos negativos.

Cuadro 23. Desempeño de la herramienta computacional con 10 imágenes por tipo de cáncer (3 tipos: 30 imágenes total)

Tipo de Cáncer	Detección Manual	Detección automática			%Sensibilidad (desempeño automático)
	Determinado por el patólogo	Verdaderos positivos (TP)	Falsos negativos (FN)	Falsos positivos	
Mama	30	20	10	8	66,6%
Leiomiosarcoma	31	12	19	13	38,7%
GIS	18	18	10	35	23,07%

De acuerdo al cuadro 23, se puede observar que la herramienta computacional presenta un mayor rendimiento para detección de mitosis en casos de cáncer de mama y su menor rendimiento se encuentra en los casos de tumor estromal gastrointestinal (GIS).

También se puede apreciar en esta tabla que el mayor número de falsos positivos registrados es en los casos de GIS debido a que las células en este tipo de tumor tienden a ser mucho más circulares y en algunos casos poseen mucha cromatina condensada en partes del tejido por lo que el programa tiende a confundirlo con un núcleo.

Por otro lado, los casos con Leiomiosarcoma tienden a registrar mayores casos de falsos negativos debido a que en la mayoría de las mitosis que se encontraban en

la placa histológica eran divisiones celulares que se encontraba en etapas de metafase y profase, debido a que en esta etapa no ha habido una separación notable en los núcleos y que la forma de las células tiende a ser alargada, el programa no es capaz de detectarlos.

Los casos de mitosis en cáncer de mama son mayormente detectados debido a que en las placas histológicas analizadas para determinar características fenotípicas de las divisiones celulares, estas se encontraban en las etapas de anafase y metafase, por lo cual se facilitó la detección de las mismas mediante el criterio de separación entre núcleos por distancia entre centroides.

En cuanto al tiempo que se demora la herramienta en detectar las mitosis, si bien depende del usuario debido a que debe ingresar algunos parámetros y seleccionar la zona de interés, se estima un promedio de 45 s por fotograma analizado.

En cuanto a la validación de la herramienta computacional diseñada, se contó con la colaboración del departamento de patología del Hospital Universitario del Valle Evaristo García (HUV) con participación especial del Dr. Josue Asprilla, residente de patología. Se mostró el funcionamiento del software desde la interfaz y se explicó el funcionamiento de la misma, así como el manejo de parámetros variables y los criterios utilizados para la detección de candidatas a mitosis. La verificación con el especialista se encuentra en el (Anexo B).

8. CONCLUSIONES

La imagen obtenida mediante la separación de planos R, G y B (Blue ratio) fue fundamental para la detección de mitosis ya que esta resalta las partes de la placa histológica que poseen mayor concentración de la tinción H & E, por lo tanto, hay una mayor posibilidad de detectar núcleos en fase mitótica.

Fue posible implementar un algoritmo capaz de detectar mitosis en placas histológicas con cáncer de mama, Leiomioma y cáncer estromal gastrointestinal (GIS) a través de características fenotípicas extraídas de una población de 50 células en mitosis, de las cuales se tomó una muestra de 31 casos tales como: área, perímetro, radio, redondez y distancia entre centroides.

La umbralización resulta ser un pilar fundamental del proceso de detección de mitosis, ya que a partir de esta se concibe la segmentación del fotograma por medio de filtrado morfológico en donde se garantiza la eliminación de regiones que constituyen material celular muy mínimo u organelos que no poseen relevancia en el desarrollo del software.

Gracias a la selección de la región de interés de la placa histológica por parte del usuario y al trabajo del programa con imágenes lógicas, fue posible que la herramienta tuviera un tiempo de ejecución menor al que actualmente es utilizado para el proceso de conteo mitótico en el Hospital Universitario del Valle (HUV).

En cuanto a la detección de mitosis en las etapas de metafase y profase, el algoritmo no es completamente funcional debido a que los toma como falsos negativos. Por otra parte cuando la célula se encuentra en telofase y las células hijas están muy separadas el programa tampoco es capaz de detectarlo ya que este tipo de mitosis estuvieron ausentes en la caracterización de fenotipos de las células en mitosis.

9. RECOMENDACIONES

Para futuros desarrollos se recomienda realizar una caracterización con una población mayor en donde se encuentren casos cuantiosos en cada una de las etapas de la división celular con el fin de que el algoritmo puede detectar mitosis en todas sus fases.

Sería interesante la implementación de un algoritmo que detectara el conteo de mitosis en tiempo real.

Trabajar con factores totalmente controlados para la digitalización de las placas histológicas con el fin de obtener muestras de mayor calidad para procesar.

BIBLIOGRAFÍA

APUNTES SOBRE PHYTON. [En línea]. PHYTON. [Consultado el 10 de Abril de 2014]. Disponible en internet: <https://www.python.org/about/quotes/>.

ARÁMBULA F., *et al.* A neural network based workstation for automated cell proliferation analysis. En: Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Vol. 3. 2001, p 2567-2570

ARIAS L.A, INDY J.J, AHUMADA R.I, BARRAGÁN H. Caracterización careotípica en mitosis y meiosis del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). [En línea]. [Consultado el 2 de Octubre de 2013]. Disponible en internet: <http://www.biologiatropical.ucr.ac.cr/attachments/volumes/vol59-2/12-Arias-Characterizacion.pdf>

BÓRQUEZ, P. y NEVEU, C. Tumores del estroma gastrointestinal (GIST), un particular tipo de neoplasia. En: Revista médica de Chile, Vol. 136, No.7, 2008, p 921-929.

CÁNCER DE MAMA: prevención y control. [En línea]. OMS. [Consultado el 28 de Agosto 2013]. Disponible en internet: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index.html>.

CÁNCER, DATOS Y CIFRAS. OMS. Centro de prensa. [En línea]. [Consultado el 20 Mayo de 2013] Disponible en internet: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/.

CARACTERÍSTICAS Y VENTAJAS DE JAVA. [En línea]. ORACLE, [Consultado el 10 de Abril de 2014]. Disponible en internet: <http://www.oracle.com/es/technologies/java/features/index.html>.

CHUAQUI R. Capítulo 6. Anatomía Patológica del Aparato Genital Femenino. [En línea]. [Consultado: 4 de Septiembre de 2013]. Disponible en internet: escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/anatomiapatologica/06Genital_fem/6cu_erro_uter2.html.

DONGMEI, C., *et al.* Atlas of Histology with functional & clinical correlations. China: Lippincott Williams & Wilkins. 2011, 496 p.

EL CÁNCER ASPECTOS BÁSICOS SOBRE SU BIOLOGÍA, CLÍNICA, PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. [En línea]. Bogotá D.C: Ministerio de Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología. [Consultado el 28 de Mayo 2013]. Disponible en internet: <http://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Contenidos/cancer.html>

FISHER, N. W. y NUTINSKY, C.L. Retroperitoneal leiomyosarcoma: a review of the literature. En: The Journal of the American Osteopathic Association, Vol. 89, No. 8, 1989 p 1058-1065.

GLOBOCAN 2008 (IARC). Pan American Health Organization, Health Information and Analysis Project. Regional Core Health Data Initiative. Washington DC, 2010.

GONZALEZ, R. C. y WOODS, R. E. Digital image processing. 3 Ed. Estados Unidos: Prentice Hall, 2007, 976 p.

IN AE HUR. Novel computer vision algorithms for automated cell event detection and analysis. Tesis de Doctorado. Iowa: University of Iowa. 2012. 210 p.

IRSHAD, H. Automated mitosis detection in histopathology using morphological and multi-channel statistics features. En: J Pathol Inform, Vol. 4, No. 10, 2013, p 4-10.

JACOBSON I, BOOCH G, RUMBAUGH J. El proceso unificado de desarrollo de software. Madrid: Pearson educación S.A, 2000, 438 p.

KHAN, AM., EL-DALY, H. y RAJPOOT, N.M. A Gamma-Gaussian mixture model for detection of mitotic cells in breast cancer histopathology images. En: 21st International Conference on Pattern Recognition (ICPR), 2012, p 149-152.

LEHR HA, MANKOFF DA, CORWIN D, SANTEUSANIO G, GOWN AM. Application of photoshop-based image analisys to quantification of hormone

receptor expression in breast cancer. [Consultado el 2 de Octubre de 2013]. Disponible en internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358857>

MAHIQUES A., Grado histológico del tumor. Sistemas de gradación de los tumores. [En línea]. Clínica Virgen del Consuelo. [Consultado el 30 de Mayo 2013]. Disponible en internet: http://www.arturomahiques.com/estadios_quirurgicos.htm

MÉNDEZ, C. y CARAMAGO, C. H. Patología humana básica aplicada a rehabilitación. Bogotá D.C.: Centro Editorial Universidad del Rosario. 2002, p 213 - 216.

MONTI, J.A., *et al.* Aplicación racional de nuevas tecnologías en función pronóstica. En: Mastología dinámica. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A. 1995, p 61-69.

OBSERVACIÓN DE INCUBADORA DE CÉLULAS – Productos BioStation CT.Nikon Instruments Europe B.V. [en línea]. España: BioStation. [Consultado: 31 de agosto de 2013]. Disponible en Internet: [http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Observacion-de-incubadora-de-celulas/BioStation-CT/\(key_features\)](http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Observacion-de-incubadora-de-celulas/BioStation-CT/(key_features)).

ORACLE, Características y ventajas de JAVA. Disponible en línea en: <http://www.oracle.com/es/technologies/java/features/index.html>. Consultado el 10 de Abril de 2014

PALACIOS CALVO, José., Factores Anatopatológicos En El Cáncer De Mama, Grado Histológico. [En línea]. Madrid, España: Hospital Universitario de la paz. [Consultado el 7 de Abril de 2014] Disponible en internet: <http://www.conganat.org/icongreso/conferencias/014/grado.htm>

PRODUCTS DESCRIPTION – KEY FEATURES. [En línea]. MATHWORKS. [consultado el 10 de Abril de 2014]. Disponible en internet: <http://www.mathworks.com/products/matlab/description1.html>.

PROGRAMAS INTERNACIONALES DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER. Instituto Nacional de cáncer de los institutos nacionales de la salud EE.UU. [en línea]. [Consultado el 25 de Mayo 2013].

PUPO J., *et al.* Graduación Histológica de Malignidad en el Carcinoma Ductal Infiltrante de la Mama. En: 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2005, 6 p.

PUSTILNIK M. Análisis de del crecimiento poblacional de cultivos celulares a tiempos prolongados, monitoreados sobre un microscopio de forma autónoma. Proyecto de Pregrado en Computación. Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2011, 65 p.

QUADE G. Grado histológico del tumor. [en línea]. Bonn, Alemania: MedNews – NATIONAL CANCER INSTITUTE. University of Bonn, Medical Center. [consultado 02 de Abril de 2013]. Disponible en internet: <http://www.meb.uni-bonn.de/cancernet/spanish/600059.html>

STROUSTRUP, B. The C++ programming Language. 3 Ed. New Jersey: Murray Hill. 1997, 869 p. ISBN 0201889544.

SUNDBLAN L, *et al.* The use of image analysis and automation for measuring mitotic index in apical conifer meristems. En: Journal of Experimental Botany, Vol. 49, No. 327, 1998, p 1749-1756.

ANEXOS

Anexo A. Tabla de caracterización de distancia entre centroides, área, perímetro, redondez y radio de células en proceso mitótico

IMAGEN	Dist Px	Dist mm	Radio	ÁREA	redondez	perímetro
mama2089	19,04	5,037666666667	16	804	0,64	125,6396
mama2239	18,77	4,966229166667	16,2	715	0,63	119,7696
mama2328	17,33	4,585229166667	14,8	688	0,4245	142,7107
GIS530	20,38	5,392208333333	13	773	0,6192	125,2548
GIS536	11,66	3,085041666667	13,4	562	0,8373	91,8406
mama02016	15,94	4,217458333333	10,3	336	0,4496	96,9117
	17,98	4,757208333333	10,6	355	0,7907	75,1127
	15,84	4,191000000000	9,61	290	0,4222	92,917
	18,12	4,794250000000	9,2	266	0,5925	75,1127
mama02024	16,98	4,492625000000	15,5	693	0,7502	107,7401
	18,99	5,024437500000	12,2	466	0,616	97,4975
	17,84	4,720166666667	12	454	0,5046	106,3259
	19,49	5,156729166667	12,9	519	0,4056	126,8112
	16,02	4,238625000000	13,1	523	0,3861	130,468
mama02042	17,78	4,704291666667	16,9	853	0,8236	114,0833
Secuencia02045	18,78	4,968875000000	18,3	1047	0,6568	141,5391
	17,25	5,905500000000	18,7	1102	0,3959	187,0366
	21,71	5,857875000000	14,4	651	0,4044	142,225
Secuencia02068	15,96	4,222750000000	13,1	539	0,5969	121,397
	21,09	5,580062500000	18,8	677	0,9278	134,468
Secuencia 02101	15,63	4,135437500000	16,59	658	0,7734	103,397
	12,49	3,304645833333	13,5	775	0,90292	103,397
	17,02	4,503208333333	13,7	832	0,8682	109,74
	11,34	3,000375000000	11,1	380	0,7233	81,25
	16,91	4,474104166667	12,9	610	0,7754	109,98
Secuencia 02106	15,85	4,193645833333	14,3	627	0,770031441	109,04
	16,92	4,476750000000	13,9	751	0,783644295	102
	16,78	4,439708333	14,8	544	0,5155	129,88
	14,26	3,772958333333	14,1	629	0,720900212	112
mama	18,95	0,5013854166667	14,1	626	0,3927	141,53391
	12,80	3,386666667	12,4	485	0,5471	84,4264

Anexo B. Carta de verificación del especialista

Santiago de Cali, Julio 23 de 2014

Verificación del especialista.

El presente documento tiene como fin demostrar que el trabajo de grado titulado "Conteo de divisiones celulares en placas histológicas con Leiomioma, tumor estromal gastrointestinal y cáncer de mama del hospital Universitario del Valle Evaristo García (H.U.V)", ha sido puesto bajo la prueba y verificación del Doctor Josué Asprilla perteneciente a la unidad de Patología de Hospital Universitario Evaristo García, el cual da fe que la propuesta desarrollada en este trabajo es un avance a la detección de mitosis celulares en tejidos cancerígenos.

La aplicación de esta se hace en cumplimiento del objetivo propuesto en el trabajo de grado y que contempla la verificación por parte de un experto.

Comentarios adicionales por parte del especialista:

El software es innovador. Necesaria para ayudar
en la detección de mitosis. Tiene potencial para
diferentes aplicaciones en Patología (especialmente
nuclear Ki-67).
Se debe aplicar en otros tipos de tumores.
Efectividad del programa en estudios inflamatorios.
Es un buen trabajo pero debe seguir publicarse.

Firma

Josué Asprilla
RN 761588-07.